

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE : SCIENCES POUR L'ENVIRONNEMENT

Laboratoire : Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline : Biochimie et Microbiologie appliquée

présentée et soutenue par

Romain Villéger

le 12 Décembre 2014

Etude *in vitro* des propriétés probiotiques de bactéries du genre *Bacillus*

Interaction avec l'hôte et effets de l'association avec un prébiotique

Thèse dirigée par le Dr. Tan-Sothéa OUK et le Pr. Philippe BRESSOLLIER

JURY :

Rapporteurs

Mme. Iryna Pinchuk, Assistant Professor, Department of Internal Medicine, University of Texas Medical Branch (USA)

M. Saïd Ennahar, Maître de Conférences HDR, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg (France)

Examineurs

Mme. Maria Urdaci, Professeur des Universités, Laboratoire de Microbiologie Bordeaux Sciences Agro, Université de Bordeaux (France)

M. Vincent Sol, Professeur des Universités, Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, Université de Limoges (France)

Directeurs

M. Tan-Sothéa Ouk, Maître de Conférences, Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, Université de Limoges (France)

M. Philippe Bressollier, Professeur des Universités, Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, Université de Limoges (France)

A mes parents

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Mme Iryna Pinchuk, Assistant Professor à la Faculté de Médecine de Houston, et M. Saïd Ennahar, Maître de Conférences HDR de l'Université de Strasbourg d'avoir accepté de juger cette thèse, et d'apporter leur expertise à ce travail. Je suis très honoré par votre présence.

Je remercie le Professeur Émérite Pierre Krauz, et le Professeur Vincent Sol, d'avoir accepté de m'accorder leur confiance pour la réalisation de ces travaux de thèse au sein du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles de Limoges. Merci Vincent pour votre écoute et vos conseils. Je remercie également la région Limousin qui a financé ces travaux pendant trois années.

Je remercie Naïma Saad pour avoir été un brillant précurseur de ce travail sur l'interaction probiotique-hôte à l'IUT. Merci pour ton soutien, tes conseils, et cette gentillesse qui t'anime.

Ce travail a permis de mettre en place des collaborations entre chimistes et biochimistes. Je remercie sincèrement Chantal Jayat-Vignoles, Catherine Ouk et Claire Carrion pour mon initiation à la cytométrie en flux et à la microscopie confocale. Je remercie Xavier Falourd et Loïc Foucat de la plateforme BiBS de Nantes-Angers pour leurs analyses en RMN ¹H et leur participation à la publication des résultats, ainsi que David Ropartz pour ses compétences et son efficacité dans l'analyse des oligosaccharides par spectrométrie de masse. Je remercie très sincèrement Emilie Pinault et Karine Vuillier-Deviller de la plateforme de protéomique de Limoges pour leur expérience, pour m'avoir formé avec autant de patience à la 2D-PAGE, et s'être investies dans mon projet de thèse.

Je remercie Anne-Marie et Claudine, ainsi que Paola et Sylvia pour m'avoir permis de réaliser les expérimentations de biologie moléculaire dans d'excellentes conditions au laboratoire de microbiologie de Bordeaux Sciences Agro.

Merci aussi à mes collègues du « privé » avec qui j'ai partagé la paillasse. On ne vient pas du même monde, mais je suis particulièrement admiratif du travail que vous réalisez. Camille, en plus d'être une super collègue, ce fut un vrai plaisir de partager d'aussi bons moments avec quelqu'un qui vient de Creuse et qui porte des bas de contention. Anaïs, premier « Docteur » du LCSN en 2014, tes qualités humaines et professionnelles sont admirables. Je ne me fais pas de soucis pour la suite de ta carrière, merci pour ton amitié et bonne route ! Carmen, je crois que je ne connais personne qui ait plus la foi que toi dans son travail. Tu es un modèle professionnel, pas seulement pour ce dur labeur d'abeille que tu accomplis, mais pour ta vision du travail et cette bonne humeur indestructible. Ce fut un réel plaisir d'avoir pu travailler avec toi.

Je remercie mes collègues du CVA, Oriane, Sarah, et Aurore pour les très bons moments passés ensemble. Je n'oublie évidemment pas ma première collègue qui m'a offert un bout de son bureau à mon arrivée, avant que je ne décide de me l'approprier définitivement, Hélène Bayol. Tu resteras l'une de mes plus belles rencontres.

Un grand merci aux fées de l'IUT, mes amies Karine Grenier et Raymonde Faure, et plus récemment Cornelia Landolt, sans qui rien ne serait possible. Karine, tu t'es plûée en quatre pour que j'exploite, que je profite, et que j'abuse des locaux de l'IUT quelles que soient les conditions. Je suis extrêmement chanceux d'avoir pu manipuler « à volonté » durant toute ma thèse. Sincèrement merci à vous trois.

J'en profite pour adresser toute ma reconnaissance à Catherine Decourt, chef du département Génie Biologique, pour sa gentillesse et pour m'avoir permis de faire de l'IUT ma deuxième maison. Je remercie par la même occasion tous mes collègues de l'IUT avec qui j'ai passé des moments exceptionnels. Dominique, Gaëlle, Jocelyne, Sophie, Etienne, François, Christophe, Mathieu, François Louvet, et bien entendu l'irremplaçable Carinne, merci pour votre accueil d'un ancien étudiant comme collègue, vous me manquerez.

Je remercie les élèves de 1^{ère} et 2^{ème} année du département pour avoir supporté mes blagues pas toujours drôles pendant les travaux pratiques de chromatographie et de biochimie. Vous avez été supers.

Je remercie les « extérieurs » qui jouent un rôle fondamental dans la vie de thésard : mon frère Gabin, les mousquetaires Pierre, Pierre-Louis, Thomas & Matthieu, mais également Marie, la meilleure amie que j'ai et qui me soutien à chaque jour, et tous les autres qui ont toujours été là. Je suis très chanceux de vous avoir tous. Merci pour tout.

Merci aux Doctorants du LCSN avec qui j'ai partagé ces trois ans. Manu le Creusois, Amandine Dodu et Manu le Suisse. C'était super d'avoir fait partie de votre « promo ». Vous serez tous les trois de supers Docteurs. Merci aux anciens : Florent, Lamia, Bassel, Nico, Julien, Grand Benj, Pierre-Henry, Pierre-Antoine, Jean-Pierre, Ahmad ; et aux nouveaux, Nicolas, Petite Amandine, Oliv, Benj, Chloé, Jean-Jean, Mac. Merci aux stagiaires de passage comme François le breton, Pauline et Juan-Carlos pour l'animation. Je remercie également Sylvie Laval pour tous ces services de secrétariat, ainsi que tous mes collègues du LCSN.

Je remercie très sincèrement les stagiaires qui ont participé avec volonté à ce travail, Marie, Emilie, Elise, et Guillaume.

Je présente mes très sincères remerciements à Maria Urdaci pour son accueil au sein de son laboratoire, mais surtout pour son expertise et sa grande implication dans mon travail. Merci de m'avoir permis de travailler avec vous, et de me permettre de continuer à le faire, c'est un réel plaisir.

Tan, Philippe, comment vous dire assez « merci » pour ces trois années passées avec vous. Je n'ai pas suffisamment de vocabulaire dans mes poches pour exprimer toute la gratitude que j'éprouve à votre égard. Merci pour votre confiance exceptionnelle envers moi, et pour m'avoir transmis avec autant de passion vos connaissances et votre foi. Je suis très heureux d'avoir commencé ma vie dans la recherche avec vous deux.

Merci à tous les membres de ma famille pour leur soutien, et à mes chers parents pour m'avoir permis de faire un travail que j'aime autant. Cette thèse est la vôtre.

Contributions Scientifiques

En lien direct avec ce travail :

Publications

Villéger R., Saad N., Grenier K., Falourd X., Foucat L., Urdaci M. C., Bressollier P. & Ouk T-S. (2014) Characterization of lipoteichoic acid structures from three probiotic *Bacillus* strains: involvement of D-alanine in their biological activity. *Antonie van Leeuwenhoek* 106(4):693-706.

Villéger R., Ropartz D., Urdaci M. C., Bressollier P. & Ouk T-S. *Bacillus subtilis* and isomaltooligosaccharides: investigation of a synbiotic potential. *En préparation pour Applied and Environmental Microbiology*.

Chapitre de livre

Saad N., Villéger R., Ouk T-S., Delattre C., Urdaci M. & Bressollier P. (2014) « Probiotics, prebiotics, and synbiotics for gut health benefits » chapitre du livre “*Beneficial Microbes in Fermented and Functional Foods*”. Taylor & Francis Group.

Communications orales

Villéger R., Ropartz D., Urdaci M. C., Bressollier P. & Ouk T-S. (2014) *Bacillus clausii* and isomaltooligosaccharides: investigation of a synbiotic potential. *International Probiotic Association World Congress, Athènes, Grèce*.

Villéger R., Saad N., Grenier K., Falourd X., Foucat L., Urdaci M. C., Bressollier P. & Ouk T-S. (2012) Structural and biological characterization of lipoteichoic acids from three probiotic *Bacillus* strains: involvement of D-alanine in their biological activity. *Séminaire à l’Institut Européen de la Chimie et de la Biologie, Bordeaux, France*.

Villéger R., Saad N., Grenier K., Falourd X., Foucat L., Urdaci M. C., Bressollier P. & Ouk T-S. (2011) Lipoteichoic acid characterization and involvement in probiotic *Bacillus* strains-host interactions. *Séminaire à l’Institut Européen de la Chimie et de la Biologie, Bordeaux, France*.

Villéger R. & Ouk T-S. (2012) Probiotics: microorganisms to improve our health. *Séminaire UNIVERS-SIEL Sciences Information en Limousin, Limoges, France*.

Communications affichées

Villéger R., Ropartz D., Urdaci M. C., Bressollier P. & Ouk T-S. (2014) *Bacillus clausii* and isomaltooligosaccharides: investigation of a synbiotic potential. *International Probiotic Association World Congress, Athènes, Grèce.*

Villéger R., Ropartz D., Urdaci M. C., Bressollier P. & Ouk T-S. (2014) *Bacillus clausii* and isomaltooligosaccharides: investigation of a synbiotic potential. *6ème European Spores Conference, Londres, Angleterre.*

Villéger R., Saad N., Grenier K., Falourd X., Foucat L., Urdaci M. C., Bressollier P. & Ouk T-S. (2013) Structural and biological characterization of lipoteichoic acids from three probiotic *Bacillus* strains: involvement of D-alanine in their biological activity. *FEMS Congress, Leipzig, Allemagne.*

Villéger R., Saad N., Grenier K., Falourd X., Foucat L., Urdaci M. C., Bressollier P. & Ouk T-S. (2011) Lipoteichoic acid characterization and involvement in probiotic *Bacillus* strains-host interactions. *Séminaire à l'Institut Européen de la Chimie et de la Biologie, Bordeaux, France.*

Autres :

Drogat N., Vergnaud J., Jauberty L., Ouk T-S., Villéger R., Granet R., Chaleix V., Sol V., Gloaguen V. (2014) Utilisation de biotine greffée pour le dosage de métaux dans une solution et kit de dosage. *WO 2014087100 A1 (Brevet international).*

Maheux A. F., Bérubé E., Boudreau D. K., Villéger R., Cantin P., Boissinot M., Bissonnette L. & Bergeron M. G. (2013). Abilities of the mCP agar method and CRENAME Alpha Toxin-specific real-time PCR assay to detect *Clostridium perfringens* spores in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology* 79(24):7654-7661.

Table des matières

Liste des abréviations	
Listes des figures	
Liste des tableaux	
Introduction générale	1
Etude Bibliographique	3
LE MICROBIOTE INTESTINAL	5
1. Généralités	5
2. Développement du microbiote intestinal.....	6
2.1. Structures et fonctions de la muqueuse intestinale et des tissus lymphoïdes associés	8
2.1.1. Structure de la barrière intestinale	8
2.1.2. Structure des tissus lymphoïdes associés à l'épithélium.....	9
2.1.3. Induction d'une réponse immunitaire intestinale.....	11
3. Rôles physiologiques du microbiote intestinal	13
3.1. Fonctions métaboliques et nutritionnelles.....	13
3.2. Fonctions de protection.....	14
3.3. Fonctions immunitaires.....	15
4. Pathologies associées au microbiote intestinal.....	16
4.1. Syndrome métabolique	18
4.2. Allergies	18
4.3. Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin	19
5. Modulation du microbiote et du système immunitaire intestinal	19
LES PROBIOTIQUES	21
1. Historique et définitions	21
2. Critères de sélection d'un probiotique.....	22
3. Principaux microorganismes utilisés en tant que probiotiques	23
4. Le genre <i>Bacillus</i> en tant que probiotique.....	25

4.1.	<i>Bacillus subtilis</i>	29
4.2.	<i>Bacillus clausii</i>	29
4.3.	<i>Bacillus cereus</i>	31
5.	Effets des probiotiques sur la santé	32
5.1.	Prévention des infections intestinales	34
5.2.	Traitement des diarrhées	34
5.2.1.	Diarrhées associées à la prise d'antibiotiques.....	35
5.2.2.	Diarrhée à <i>Rotavirus</i> aiguë	35
5.3.	Probiotiques et Immunomodulation.....	36
5.3.1.	Effets des probiotiques chez l'Homme sain	36
5.3.2.	Effets des probiotiques dans les phénomènes allergiques	38
5.3.3.	Effets des probiotiques sur les pathologies inflammatoires.....	38
5.4.	Prévention du cancer et effets anti-tumoraux.....	39
6.	Mécanismes d'action des probiotiques.....	39
6.1.	Modification du microbiote intestinal.....	41
6.2.	Augmentation de l'effet barrière	42
6.3.	Effets immunomodulateurs	42
6.3.1.	Effets sur les cellules épithéliales intestinales	43
6.3.2.	Effets sur les cellules dendritiques.....	43
6.3.3.	Effets sur les lymphocytes B	45
6.3.4.	Effets sur les lymphocytes T.....	45
7.	Implication des entités moléculaires de la surface bactérienne dans l'interaction probiotique/hôte.....	45
7.1.	Rappels sur la composition de la paroi des bactéries à Gram positif.....	46
7.2.	Interaction entre les récepteurs de l'hôte et les constituants de la paroi bactérienne	47
7.2.1.	Les constituants protéiques de la paroi bactérienne.....	48
7.2.2.	Les polysaccharides associés à la paroi	50
7.2.3.	Le peptidoglycane.....	50

7.2.4. Les acides téichoïques	50
LES PREBIOTIQUES	57
1. Historique et définitions	57
2. Structures et obtention des prébiotiques les plus connus	58
3. Mode d'action des prébiotiques et effets associés.....	59
3.1. Effets sur la composition et l'activité de la flore du tractus intestinal	60
3.2. Effets sur le système immunitaire	62
3.3. Autres effets	64
EFFET DES PREBIOTIQUES SUR LES PROBIOTIQUES : CONCEPT DE SYNBIOTIQUE	67
1. Définitions	67
2. Synbiotiques commerciaux et effets sur la santé.....	67
Objectifs des travaux	71
Matériel et Méthodes	73
EVALUATION DU POTENTIEL SYNBIOTIQUE D'UNE ASSOCIATION DE LA SOUCHE PROBIOTIQUE <i>B. SUBTILIS</i> CU1 AVEC UN SUBSTRAT PREBIOTIQUE DE TYPE ISOMALTOOLIGOSACCHARIDE	75
1. Oligosaccharides prébiotiques.....	75
2. Analyse des oligosaccharides par spectrométrie de masse.....	76
2.1. MALDI-MS	76
2.2. ESI-MS	76
3. Souche bactérienne.....	77
4. Milieux de culture	77
5. Conditions de culture.....	78
6. Etablissement des courbes de croissance.....	78
6.1. En absence de bile.....	78
6.2. En présence de bile	78
7. Numération bactérienne.....	79
8. Analyse des oligosaccharides par chromatographie en phase liquide.....	79

8.1.	Analyses sur colonne Rezex™ RSO Oligosaccharides Ag ⁺ (4%).....	79	
8.2.	Analyses sur colonne Aminopropyle	80	
9.	Détermination des activités glycohydrolasiques	80	
10.	Dosage des acides gras à chaîne courte et de l'acide lactique	81	
11.	Test d'adhésion sur cellules Caco-2	82	
11.1.	Préparation des cellules Caco-2	82	
11.2.	Préparation des bactéries.....	82	
12.	Analyse du protéome de <i>B. subtilis</i> CU1 par électrophorèse bidimensionnelle	83	
12.1.	Extraction des protéines totales.....	83	
12.2.	Précipitation des protéines	83	
12.3.	Dosage des protéines.....	84	
12.4.	Première dimension : isoélectrofocalisation	84	
12.4.1.	Réhydratation des bandes d'IPG.....	84	
12.4.2.	IEF	85	
12.5.	Deuxième dimension : SDS-PAGE	85	
12.6.	Coloration des gels au bleu colloïdal (G-250)	86	
12.7.	Analyse des gels.....	87	
12.8.	Analyse des spots protéiques par spectrométrie de masse en mode ESI-MS	87	
12.8.1.	Etape de lavage des échantillons	87	
12.8.2.	Digestion des protéines.....	87	
12.8.3.	Extraction des peptides tryptiques.....	88	
12.8.4.	Analyse nano-LC QTRAP	88	
12.8.5.	Recherche dans les bases de données	88	
ETUDE DE LA RELATION STRUCTURE-ACTIVITE DES ACIDES			
LIPOTEICHOÏQUES DE TROIS SOUCHES PROBIOTIQUES DU GENRE <i>BACILLUS</i>			91
1.	Souches bactériennes.....	91	
2.	Conditions de culture.....	91	
3.	Extraction et purification des acides lipotéichoïques (LTAs)	92	
3.1.	Extraction des LTAs au <i>n</i> -butanol et hydrolyse des esters de D-alanine.....	92	

3.2.	Purification des LTAs par chromatographie	93
3.2.1.	Chromatographie d'interactions hydrophobes.....	93
3.2.2.	Chromatographie d'échange d'ions.....	93
3.3.	Contrôle de la stabilité chimique des LTAs par CCM.....	94
4.	Caractérisation chimique des LTAs	94
4.1.	Dosage du phosphore	94
4.2.	Détermination de la composition en oses et glycérol.....	94
4.2.1.	Hydrolyse par l'acide trifluoroacétique	95
4.2.2.	Dérivation au TMSIM	95
4.2.3.	Analyse chromatographique des oses et du glycérol.....	95
4.3.	Analyse de la composition en acides gras.....	97
4.3.1.	Préparation des esters méthyliques d'acides gras par méthanolyse.....	97
4.3.2.	Analyse des esters méthyliques d'acides gras	98
4.4.	Analyse de la composition en acides aminés	98
4.4.1.	Préparation des échantillons	99
4.4.2.	Analyse des PTC-AA par HPLC en phase inverse.....	99
5.	Caractérisation structurale des LTAs par RMN ¹ H.....	100
5.1.	RMN ¹ H	100
5.2.	Elucidation de la structure des LTAs	101
6.	Détermination de l'activité biologique des LTAs	102
6.1.	Modèles cellulaires utilisés	102
6.2.	Détermination de l'induction de gènes chez des cellules Caco-2 par RT-qPCR	102
6.2.1.	Stimulation des cellules Caco-2.....	103
6.2.2.	Extraction des ARNs totaux et rétrotranscription en ADNn complémentaires.	103
6.2.3.	Quantification des gènes exprimés par qPCR en temps réel	103
6.3.	Quantification de la production de cytokines par les PBMCs, par la méthode ELISA	104

6.3.1. Préparation des cellules mononuclées périphériques du sang humain (PBMCs)	104
6.3.2. Stimulation des PBMCs et dosage des cytokines par ELISA.....	105
6.4. Mesure de la production de monoxyde d'azote (NO) par des macrophages murins RAW 264.7	105
Résultats et Discussion.....	107
EVALUATION DU POTENTIEL SYNBIOTIQUE D'UNE ASSOCIATION DE LA SOUCHE PROBIOTIQUE <i>B. SUBTILIS</i> CU1 AVEC UN SUBSTRAT PREBIOTIQUE DE TYPE ISOMALTOOLIGOSACCHARIDE	109
1. Choix d'un couple probiotique/prébiotique.....	111
2. Caractérisation des IMOS par chromatographie liquide et spectrométrie de masse	114
3. Suivi de la croissance de <i>B. subtilis</i> CU1 sur IMOS	119
3.1. Détermination des cinétiques de croissance.....	119
3.2. Utilisation de la source carbonée lors de la croissance sur IMOS	121
4. Détermination de l'activité glyco-hydrolasique	124
4.1. Détermination du type d'activité glyco-hydrolasique dans le cytosol et le surnageant de culture de <i>B. subtilis</i> CU1	124
4.2. Suivi de l'activité α -glucosidase au cours de la croissance.....	126
5. Suivi de la production d'acides gras à chaîne courte et d'acide lactique	128
6. Analyse du protéome de <i>B. subtilis</i> CU1 par électrophorèse bidimensionnelle (2D-PAGE)	130
7. Adhésion de <i>B. subtilis</i> CU1 aux cellules épithéliales intestinales	140
8. Tolérance à la bile de <i>B. subtilis</i> CU1	141
8.1. Tolérance des cellules végétatives à la bile.....	142
8.2. Tolérance des spores à la bile.....	145
8.3. Activité α -glucosidase et utilisation de la source carbonée lors de la croissance de <i>B. subtilis</i> CU1 en présence de bile.....	148
9. Influence de la source carbonée sur la structure d'entités moléculaires de la surface de <i>B. subtilis</i> CU1 : les acides lipotéichoïques	154
Conclusion & perspectives	159

ETUDE DE LA RELATION STRUCTURE/ACTIVITE DES ACIDES LIPOTEICHOÏQUES DE TROIS SOUCHES PROBIOTIQUES DU GENRE <i>BACILLUS</i>	163
1. Extraction et purification des LTAs	165
2. Caractérisations chimique et structurale des LTAs	167
2.1. Caractérisation des LTAs par dosages biochimiques.....	168
2.2. Caractérisation des LTAs par RMN ¹ H.....	168
3. Détermination de l'activité biologique des LTAs purifiés	174
3.1. Etude de l'effet des LTAs purifiés sur la synthèse de gènes cellulaires par PCR quantitative	174
3.2. Mesure de la production de cytokines par des PMBCs.....	179
3.3. Mesure de la production de NO par des cellules RAW 264.7	181
4. Rôle de la D-alanine dans l'activité immunologique des LTAs.....	184
4.1. Caractérisation structurale des LTAs déalanylés	184
4.2. Détermination de la production de NO par les LTAs déalanylés sur cellules RAW 264.7	186
Conclusion & perspectives	191
Conclusion générale	195
Références bibliographiques	197

Liste des abréviations

2D-PAGE : two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis

A

A : Ampères
 ADN : acide désoxyribonucléique
 ADNc : ADN complémentaire
 AGCC : acide gras à chaîne courte
 APS : persulfate d'ammonium
 ARN : acide ribonucléique
 ATCC : american type culture collection
 AXOS : arabinoxylooligosaccharides

C

CCM: chromatographie sur couche mince
 CHAPS : 3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate

D

D-ala : D-alanine
 DIC : dissociation induite par collision
 DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
 dNTP : désoxynucleotide triphosphate
 DO : densité optique
 DP : degré de polymérisation
 DTT : dithiothréitol

E

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid
 ELISA : enzyme-linked immunosorbant assay
 ESI-MS : electrospray ionization-mass spectrometry

F

FAO : Food and Agriculture Organization (of the United Nations)
 FID : free induction decay
 FOS : fructooligosaccharide

G

g : gramme
 GlcOS : glucooligosaccharides
 GN : *N*-acétylglucosamine
 GOS : galactooligosaccharides
 GRAS : generally recognized as safe

H

h : heures

I

IEF : isoélectrofocalisation
 Ig : immunoglobuline
 IMOS : isomaltoligosaccharide
 INF : interféron
 IPG : isoelectric pH gradient/gradient de pH isoélectrique

L

L : litre
 LAL : *Limulus ameobocyte* assay
 L-NAME : L-Nitro Arginine Methyl Ester
 LPS : lipopolysaccharide
 LTA : lipoteichoic acid/acide lipotéichoïque

M

m : mètre
 M : moles par litre
 MAMP : microbe-associated molecular pattern/motifs moléculaires associées aux microbes
 MALDI-MS : matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry
 MH : Mueller-Hinton
 MICI : maladie inflammatoire chronique de l'intestin
 min : minutes

N

NK : cellule « natural killer »

P

PBMC : peripheral blood mononuclear cell/cellule mononuclée du sang périphérique
 PBS : phosphate buffered saline
 pH : potentiel hydrogène
 PITC : phénylisothiocyanate
 plgR : récepteurs à immunoglobuline polymérique
 PNP : para-nitrophénol
 ppm : partie par million
 PRR : pattern recognition receptor
 PTC-AA : acides aminés phénylthiocarbamyl

Q

Q.S.P. : quantité suffisante pour

R

RMN : résonance magnétique nucléaire

rpm : rotations par minute

RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium

RT-qPCR : Reverse Transcription-quantitative
polymerase chain reaction

S

SDS : sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate

polyacrylamide gel electrophoresis

SVF : sérum de veau fœtal

T

Temed : Tétraméthyléthylènediamine

TFA : trifluoroacetic acid/acide trifluoroacétique

TLR : toll-like receptor

TNF : tumor necrosis factor

TOF : time of flight

Tris : 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol

TSPA : 2,2,3,3-acide 3-triméthylsilyl-propionique-
d4 sodique

U

U.A. : unités arbitraires

UFC : unité formant colonie

UV : ultraviolet

V

V : Volt

W

WHO : world health organization

X

XOS : xylooligosaccharides

Liste des figures

Figure 1 : Composition de la flore microbienne du tractus gastro-intestinal (adapté de (adapté de Isolauri <i>et al.</i> 2004).	6
Figure 2 : Structure du microbiote humain à travers les cycles de la vie (d'après Kostic <i>et al.</i> 2013).....	7
Figure 3: Représentation schématique de la barrière intestinale et des tissus lymphoïdes associés (adapté de Mowat (2003) et de Weng (2013)).	9
Figure 4 : Représentation schématique des différents modes de capture des antigènes par la muqueuse intestinale (adapté de Artis (2008) et de Lebeer (2010)).	11
Figure 5 : Représentation schématique de "l'éducation" du système immunitaire nécessaire à son développement (modifié de Rook <i>et al.</i> 2014).	17
Figure 6: Cycle de vie de <i>Bacillus subtilis</i> dans l'environnement (adapté de Cutting 2014).	26
Figure 7: Antibiorésistance des souches de <i>Bacillus clausii</i> du produit Enterogermina®	30
Figure 8: Représentation schématique des principaux mécanismes d'action des probiotiques (adapté de Ng <i>et al.</i> 2009).	41
Figure 9: Représentation schématique des mécanismes d'immunomodulation induits par les probiotiques au niveau de la muqueuse intestinale. L'interaction directe avec les cellules épithéliales intestinales entraîne une modulation de leur activité pouvant conduire à la production de cytokines (A). L'interaction directe des bactéries avec les DC (B), ou leur translocation vers la <i>lamina propria</i> (C), peut conduire à la production de cytokines par les DC et macrophages, et conduire à l'activation des immunités innée et adaptative. Une fois les cellules M traversées, et l'absorption par les CPAs, la présentation des antigènes aux lymphocytes T natifs va conduire à leur activation (D). Consécutivement à cette interaction, une cascade de signalisation peut entraîner une réponse immunitaire des muqueuses, avec entre autre la sécrétion d'IgA dans l'intestin (E). Ce sont les mêmes processus qui vont orienter les composants du système immunitaire vers un motif tolérogène non-inflammatoire, par l'induction de cellules T régulatrices (F).	44
Figure 10: Composition et structure de la paroi des bactéries à Gram positif (modifié de Delcour <i>et al.</i> 1999).	46
Figure 11: Principales structures d'acides lipotéichoïques (d'après Schneewind <i>et al.</i> 2014). (A) Structure des LTAs de type I de <i>Staphylococcus aureus</i> . Le nombre d'unités répétées (n) est indiqué près des crochets, les unités répétées de glycérol-phosphate sont substituées en position 2 du glycérol (X) par des protons hydrogènes, des esters de D-alanine ou de la N-acétylglucosamine. (B) Structure des LTAs de type II de <i>Lactobacillus garvieae</i> . (C) Structure des LTAs de type III de <i>Clostridium innocuum</i> . Les unités répétées de glycérol-phosphate sont substituées en position 2 du glycérol (Y) par des protons hydrogènes, de la glucosamine ou de la N-acétylglucosamine. (D) Structure des LTAs de type IV de <i>Streptococcus pneumoniae</i> . Les unités répétées de glycérol-phosphate peuvent être substituées avec des protons hydrogènes, des esters de D-alanine ou de la N-acétylglucosamine (X). Les substituants R, R' et R'' des glycolipides sont des chaînes alkyles.	52
Figure 12: Mécanismes d'action et principaux effets associés à la consommation de prébiotiques (adapté de Saad <i>et al.</i> 2014).	60
Figure 13: Gradient de voltage au cours de l'étape d'IEF.....	85

Figure 14: Réaction de dérivation des fonctions hydroxyles par le TMSIM	95
Figure 15: Gradient de température utilisé pour l'analyse des dérivés triméthylsilylés par CPG/SM.	96
Figure 16: Réaction de dérivation des fonctions amines par le PITC.	98
Figure 17: Séparation des IMOS sur colonne Rezex [®] Oligo Ag ⁺ (4%)	115
Figure 18: Analyse des IMOS par spectrométrie de masse en MALDI-TOF (A) en mode réflecteur (B) en mode linéaire.....	116
Figure 19: Distribution en pourcentage (p/p) des degrés de polymérisation des IMOS.	117
Figure 20: Spectre de masse ESI-MSMS des IMOS de DP 6.....	118
Figure 21: Structure générale des IMOS commerciaux déterminée par spectrométrie de masse ESI-MS	119
Figure 22: Représentation des cinétiques de croissance de <i>B. subtilis</i> CU1 en milieu minimum sur glucose, IMOS, glucose/IMOS et milieu seul, établies par mesure de DO à 595 nm (A), et par numération sur gélose (B).....	120
Figure 23: Analyse quantitative par chromatographie liquide sur colonne Rezex [®] des oligosaccharides dans le surnageant de culture de <i>B. subtilis</i> CU1 au cours de la croissance sur IMOS comme unique source carbonée (A), et sur glucose/IMOS en mélange (B)	122
Figure 24: Dosage par chromatographie liquide sur colonne Aminopropyle du glucose, maltose et isomaltose dans le surnageant de culture de <i>B. subtilis</i> CU1 au cours de la croissance. IMOS comme unique source carbonée (A) ; glucose/IMOS en mélange (B).....	123
Figure 25: Détermination des activités glyco-hydrolasiques dans le cytosol et le surnageant de culture de <i>B. subtilis</i> CU1, après croissance sur glucose ou IMOS comme substrats uniques. Les résultats présentés sont la moyenne de deux expériences indépendantes.	125
Figure 26: Suivi cinétique de la production de l'activité α -glucosidase dans le surnageant de <i>B. subtilis</i> CU1 avec les IMOS comme unique source carbonée ou en mélange avec du glucose. Les résultats présentés sont la moyenne de deux expériences indépendantes.	126
Figure 27: Concentrations en AGCCs et en acide lactique déterminées par chromatographie liquide dans le surnageant de culture de <i>B. subtilis</i> CU1. (A) substrat carboné glucose; (B) substrat carboné IMOS. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences indépendantes \pm écart-type.	129
Figure 28: Profil du protéome de <i>B. subtilis</i> CU1 par 2D-PAGE après croissance sur glucose (A) ou IMOS (B). Gel 10% acrylamide, pH 4-7, coloration au bleu colloïdal G-250. Identification des variants analysés par un numéro sur le gel A.	131
Figure 29: Voie hypothétique d'utilisation des IMOS par <i>B. subtilis</i> CU1. MalL : oligo- α (1 \rightarrow 6)-glucosidase ; GlvA : maltose-6-phosphate glucosidase ; G6PDH : glucose-6-phosphate déshydrogénase.	137
Figure 30: Représentation schématique des voies de la glycolyse et du cycle de Krebs chez <i>Bacillus subtilis</i> . Les enzymes identifiées comme surexprimées en présence d'IMOS sont indiquées en vert, les sous-exprimées sont indiquées en rouge.	139
Figure 31: Pourcentage d'adhésion de <i>B. subtilis</i> CU1 sur cellules Caco-2. Après 8, 12, 24, et 36 h de croissance sur substrat glucose ou IMOS, les cellules de <i>B. subtilis</i> CU1 sont lavées et incubées pendant 1 h avec les cellules Caco-2 confluentes. Après lavage, le nombre d'UFC adhérentes est déterminé par dénombrement sur	

gélose. Les résultats représentent la moyenne de trois essais indépendants \pm écart-type ; $*p < 0,05$ comparativement à la condition glucose.	141
Figure 32: Représentation des cinétiques de croissance de la souche <i>B. subtilis</i> CU1 en milieu minimum avec glucose ou IMOS comme unique source carbonée et en présence de 0,5% (A) et 1% (B) de bile. Le milieu a été encemencé par 10^6 cellules végétatives/mL et incubé en plaque 48 puits à 37°C/48 h. La lecture de DO est réalisée à 595 nm toutes les heures. Les résultats représentent les absorbances moyennes dans 4 puits \pm écart type.....	143
Figure 33: Effet de 0,5% de bile sur la croissance de <i>B. subtilis</i> CU1 en plaque 48 puits avec glucose ou IMOS comme unique substrat carboné. Les résultats obtenus représentent la moyenne \pm écart type de trois expériences indépendantes de dénombrements sur gélose.	145
Figure 34: Représentation des cinétiques de croissance de la souche <i>B. subtilis</i> CU1 en milieu minimum avec glucose ou IMOS comme unique source carbonée et en présence de 0,5% (A) et 1% (B) de bile. Le milieu a étéensemencé par 10^6 spores/mL et incubé en plaque 48 puits à 37°C / 48h. La lecture de DO est réalisée à 595 nm toutes les heures. Les résultats représentent les absorbances moyennes dans 4 puits \pm écart type.	146
Figure 35: Intérêt potentiel de l'utilisation d'IMOS comme substrat prébiotique associé à l'ingestion du probiotique <i>B. subtilis</i> CU1.....	147
Figure 36: (A) Dosages du glucose, maltose et isomaltose sur colonne Aminopropyle au cours de la croissance de <i>B. subtilis</i> CU1 en présence de 0,5% de bile, avec les IMOS comme unique substrat carboné. Les résultats obtenus représentent la moyenne de trois expériences \pm écart type. (B) Rappel de la cinétique de croissance de <i>B. subtilis</i> CU1 en présence de 0,5% de bile, avec les IMOS comme unique substrat carboné....	148
Figure 37: Suivi cinétique de la production d'activité α -glucosidase dans le surnageant de culture de <i>B. subtilis</i> CU1 en présence de bile. Croissance en milieu minimum supplémenté avec 1% d'IMOS (p/v) en présence de 0,5% (p/v) de bile. Les résultats présentés sont les moyennes de deux expériences indépendantes.	149
Figure 38: Dosage des glucides dans le surnageant de culture de <i>B. subtilis</i> CU1 au cours de la croissance en présence de bile. Croissance en milieu minimum supplémenté avec 1% d'un mélange glucose/IMOS en présence de 0,5% (p/v) de bile. Les résultats présentés sont les moyennes de deux expériences indépendantes.	150
Figure 39: Suivi cinétique de la production de l'activité α -glucosidase dans le surnageant de culture de <i>B. subtilis</i> CU1 en présence de bile. Croissance en milieu minimum supplémenté avec 1% d'un mélange glucose/IMOS en présence de 0,5% (p/v) de bile. Les résultats présentés sont les moyennes de deux expériences indépendantes.....	150
Figure 40: Spectre RMN ^1H total des LTAs de <i>B. subtilis</i> CU1 cultivé sur glucose.	155
Figure 41: (A) Structure moléculaire générale des LTAs de <i>B. subtilis</i> CU1 d'après les analyses RMN ^1H . n représente le nombre d'unités glycérol-phosphate et R le groupe de substitution pouvant être un groupement hydroxyle (Hydroxy), de la D-alanine (D-ala) ou de la N-acétylglucosamine (GN). (B) Spectre RMN ^1H des LTAs de <i>B. subtilis</i> CU1 cultivé sur glucose, (C) cultivé sur IMOS.	156
Figure 42: Hypothèse de l'effet des IMOS sur la souche <i>B. subtilis</i> CU1 <i>in vivo</i>	160
Figure 43: Organigramme de présentation de la stratégie adoptée pour l'étude de la relation structure-activité des LTAs	164

Figure 44: Chromatogramme obtenu lors de la purification des LTAs de <i>B. subtilis</i> CU1 par chromatographie d'interactions hydrophobes. Le gradient d'élution par le 1-propanol est représenté en orange. Les flèches indiquent les limites d'élution des LTAs	165
Figure 45: Chromatogramme obtenu lors de la purification des LTAs de <i>B. subtilis</i> CU1 par chromatographie d'échange d'ions. Le gradient d'élution par le NaCl est représenté en orange. Les flèches indiquent les limites de collecte de la fraction de LTAs purifiés.	166
Figure 46: CCM des LTAs extraits de <i>B. subtilis</i> CU1 après 15, 30 et 60 jours de conservation à -20°C. Un témoin a été réalisé avec de la D-alanine. L'élution est réalisée sur une phase stationnaire de cellulose microcristalline par un mélange butanol/acide acétique/eau 3:3:1 (v/v/v). Révélation par de la ninhydrine 1% dans l'acétone et incubation à 110°C/15min.	167
Figure 47: (A) Structure moléculaire générale des LTAs de <i>Bacillus</i> d'après les analyses RMN ¹ H. n représente le nombre d'unités glycérol-phosphate et R le groupe de substitution pouvant être un groupement hydroxyle (Hydroxy), de la D-alanine (D-ala) ou de la N-acétylglucosamine (GN). (B) Spectre RMN ¹ H de <i>B. cereus</i> CH, (C) de <i>B. subtilis</i> CU1, et (D) de <i>B. clausii</i> O/C.	169
Figure 48: Concentration en endotoxines (en unités enzymatiques/mL) dans les LTAs utilisés pour cette étude. Le LPS de <i>Escherichia coli</i> est utilisé comme contrôle positif, et de l'eau ultrapure dépourvue d'endotoxine est utilisée comme contrôle négatif.	173
Figure 49: Etude de la transcription de gènes impliqués dans les effets probiotiques induits par les LTAs purifiés. Les taux d'expression des gènes IL-1 (A), IL-6 (B), IL-8 (C), IL-10 (D), MUC2 (E), MUC13 (F) et Cadherine (G) ont été mesurés par RT-qPCR, et sont rapportés à la condition contrôle, normalisée à un taux d'expression de 1 pour chaque réplicat. Les résultats représentent les moyennes ± écart type de trois expériences indépendantes.	176
Figure 50: Production de cytokines par des PBMCs. Les concentrations en cytokines TNF- α (A), IL-8 (B) et IL-10 (C) dans le surnageant de culture ont été déterminées par la méthode ELISA. Ces résultats représentent les moyennes ± écarts type de trois expériences indépendantes réalisées sur trois donneurs différents.	179
Figure 51: Production de nitrites comme indicateurs de l'inflammation par les cellules RAW 264.7 après 48 h d'incubation avec les LTAs extraits des trois <i>Bacilli</i> probiotiques, à 0,1, 1 et 10 μ g/mL. Les résultats représentent la moyenne ± écart type de trois expériences indépendantes. [#] $p < 0,05$; ^{**} $p < 0,01$ comparativement au contrôle ; [^] $p < 0,05$ comparativement aux LTAs de <i>B. cereus</i> à 10 μ g/mL ; ^{##} $p < 0,05$ comparativement aux LTAs de <i>S. aureus</i> commerciaux à 10 μ g/mL.	182
Figure 52: Spectres RMN ¹ H des LTAs déalanylés de (A) <i>B. cereus</i> CH, (B) <i>B. subtilis</i> CU1 et (C) <i>B. clausii</i> O/C.	185
Figure 53: Production de nitrites comme indicateur de l'inflammation par les cellules RAW 264.7 après 48 h d'incubation avec les LTAs natifs et déalanylés à 10 μ g/mL. Les résultats représentent la moyenne ± écart type de trois expériences indépendantes. [*] $p < 0,01$	187
Figure 54: Interactions inter- et intramoléculaires supposées à pH 7 dans la chaîne hydrophile des LTAs.	188
Figure 55: Schéma réactionnel du marquage des fonctions amines libres des LTAs par la fluorescamine.	192

Figure 56: Distribution subcellulaire des LTAs marqués de *B. subtilis* CU1 et incubés sur cellules Caco-2. 30 µg de LTAs sont marqués avec une solution de fluorescamine à 30 mg/mL pendant 15 min à température ambiante. Les LTAs marqués sont dilués à 5 µg/mL dans du milieu de culture et incubés 45 min avec les cellules Caco-2. La visualisation est réalisée par microscopie confocale ($\lambda_{\text{ex}} = 390 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 475 \text{ nm}$). 193

Liste des tableaux

Tableau 1: Principaux probiotiques utilisés chez l'humain (modifié de Pyar <i>et al.</i> , 2013).....	24
Tableau 2: Principaux produits commerciaux contenant une ou plusieurs souches de <i>Bacillus</i> probiotique (d'après Cutting 2011)	28
Tableau 3: Principaux effets bénéfiques associés à la prise de probiotiques et mécanismes supposés d'après Nagpal et coll. (2012).....	34
Tableau 4: Principaux mécanismes d'action des probiotiques d'après Ng <i>et al.</i> (2009).	40
Tableau 5: Rôle des protéines de surface dans l'interaction avec l'hôte (d'après Sánchez <i>et al.</i> 2008).	49
Tableau 6: Principaux effets des AGCCs sur la santé (traduit de Saad <i>et al.</i> 2014)	62
Tableau 7: Synbiotiques commerciaux et leur composition (Adapté de Saad <i>et al.</i> 2014).....	68
Tableau 8: Principaux résultats obtenus avec les produits Synbiotic 2000 et Forte 2000 (adapté de Bengmark <i>et al.</i> 2010).....	69
Tableau 9: Liste des oligosaccharides commerciaux utilisés au cours de cette étude.....	75
Tableau 10: Composition du milieu minimum utilisé pour la croissance des souches de <i>Bacillus</i>	77
Tableau 11: Composition du tampon de réhydratation des bandes d'IPG.....	84
Tableau 12: Composition du gel de polyacrylamide.....	86
Tableau 13: Liste des souches commerciales étudiées et leurs origines.	91
Tableau 14: Composition des tampons d'élution utilisés pour l'analyse de la composition en acides aminés.	99
Tableau 15: Gradient d'élution utilisé pour l'analyse HPLC des PTC-AA.	100
Tableau 16: Déplacements chimiques et constantes de couplages utilisés pour l'élucidation de la structure des LTAs par RMN ¹ H.....	101
Tableau 17: Principales études concernant l'association d'un prébiotique avec un probiotique du genre <i>Bacillus</i>	110
Tableau 18 : Prébiotiques sélectionnés pour l'étude et informations sur les structures communiquées par les fournisseurs.....	112
Tableau 19 : Observation visuelle en milieu solide de la croissance de souches probiotiques du genre <i>Bacillus</i> sur différentes sources carbonées prébiotiques.	113
Tableau 20: Protéines différemment exprimées chez <i>B. subtilis</i> CU1 entre la condition glucose et la condition IMOS. Les protéines identifiées sont classées par catégorie fonctionnelles. Les numéros d'accès correspondent à la banque UniProt, et les numéros de spots correspondent à ceux indiqués sur les gels Figure 28.	134
Tableau 21: Protéines impliquées dans le métabolisme et le transport des IMOS chez <i>Bacillus subtilis</i> CU1. Comparaison de l'expression protéique entre la condition glucose et la condition IMOS.	135
Tableau 22: Analyse structurale des LTAs de <i>B. subtilis</i> CU1 par RMN ¹ H après croissance sur milieu MH, glucose ou IMOS comme unique source carbonée.	157
Tableau 23: Composition chimique des acides lipotéichoïques de chacune des souches étudiées.	168

Tableau 24: Analyse structurale des LTAs de <i>B. cereus</i> CH, <i>B. subtilis</i> CU1, et <i>B. clausii</i> O/C par RMN ^1H après croissance sur milieu MH.	170
Tableau 25: Composition en acides gras des LTAs de <i>B. cereus</i> CH, <i>B. subtilis</i> CU1 et <i>B. clausii</i> O/C déterminée par GC-MS.	172
Tableau 26: Analyse structurale des LTAs de <i>B. cereus</i> CH, <i>B. subtilis</i> CU1, et <i>B. clausii</i> O/C par RMN ^1H après déalanlylation.	186

Introduction générale

L'homéostasie du tractus intestinal repose sur un équilibre entre le microbiote intestinal et le système immunitaire associé à la muqueuse. En cas de déséquilibre, une dérégulation du système immunitaire peut entraîner l'apparition de pathologies telles que les allergies et les maladies inflammatoires chroniques. Les probiotiques sont des microorganismes vivants, qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates peuvent affecter positivement la santé de l'hôte. Leur utilisation, initialement fondée sur des observations empiriques, est actuellement plus rationnelle, et confortée par de nombreux travaux. Une clarification des mécanismes par lesquels ces bactéries ou leurs métabolites pourraient renforcer l'homéostasie intestinale, permettrait une sélection plus efficace de souches actives ainsi que la détermination des protocoles optimaux d'administration. Les genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, qualifiés de « bactéries bénéfiques » et résidents du tractus intestinal, ont été majoritairement étudiés et utilisés. De nombreuses études montrent que ces microorganismes probiotiques sont capables d'interagir avec le système immunitaire intestinal conduisant à une réponse immune régulatrice. Ainsi, une administration orale de ces deux genres bactériens permet de prévenir ou diminuer les symptômes résultant d'un dysfonctionnement du microbiote intestinal. Le concept de probiotique a été étendu à l'utilisation d'autres souches, absentes de la flore endogène du tractus intestinal.

Parmi elles, les bactéries du genre *Bacillus*, capables de résister sous forme de spores aux conditions extrêmes de pH lors du passage dans l'estomac, possèdent des activités antimicrobiennes vis-à-vis de pathogènes, et des propriétés immunomodulatrices. Ces dernières nécessitent l'interaction entre la bactérie, plus exactement les entités moléculaires de la surface bactérienne et les cellules intestinales. Toutefois, l'ingestion de spores de *Bacillus* probiotique ne conduit pas à l'implantation définitive de la souche au sein du microbiote. En effet, les probiotiques du genre *Bacillus* sont considérés comme des résidents transitoires de la flore intestinale et leur développement potentiel au sein de cet environnement dépend des conditions, principalement nutritionnelles, qui y règnent.

Une première partie des travaux menés au cours de la thèse a consisté à associer un oligosaccharide prébiotique de type isomaltooligosaccharide (IMOS) à une souche probiotique *Bacillus subtilis*. Le principal objectif de cette association est de favoriser le développement et l'accroissement du temps de séjour de la souche dans le tractus intestinal, en augmentant la disponibilité du substrat carboné. Le substrat IMOS a fait l'objet d'une sélection parmi plusieurs prébiotiques. Il a été sélectionné pour sa capacité à être facilement métabolisé par les bactéries du genre *Bacillus*, mais également pour sa production simple et peu coûteuse industriellement. L'effet *in*

vitro des IMOS, sur le développement et la résistance à la bile de la souche probiotique, a été étudié afin de mettre en évidence le potentiel de cette association synbiotique. La seconde partie de la thèse s'est intéressée à l'interaction entre bactéries probiotiques et cellules de l'hôte. L'objectif était de comparer la structure des acides lipotéichoïques (LTAs), polymères amphiphiles extraits de la paroi de trois souches probiotiques du genre *Bacillus*, dans l'objectif d'établir une corrélation entre les différences structurales observées et les activités biologiques respectives associées à ces molécules. L'implication des résidus D-alanine des LTAs dans l'activité biologique de ces molécules, a été étudiée par la mise en œuvre d'une modification chimique spécifique. Ces travaux s'inscrivent plus largement dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans l'interaction bactérie probiotique-hôte, un préalable nécessaire à l'optimisation de l'utilisation de tels microorganismes.

Le manuscrit de la thèse se subdivise en trois parties. La première d'entre elles sera consacrée à une étude bibliographique. Elle décrit dans un premier temps le microbiote intestinal, son développement et ses fonctions, en incluant les pathologies qui lui sont associées. Cette première section permettra de comprendre l'origine et le fonctionnement des concepts introduits par la suite, que sont les notions de probiotiques, prébiotiques et synbiotiques. Elle sera conclue par la présentation des objectifs du travail de thèse. La seconde partie du manuscrit sera consacrée à la description du matériel et des méthodes mis en œuvre pour mener à bien ce projet. La dernière partie exposera les résultats obtenus au cours de cette thèse. Les résultats, concernant l'étude de l'association d'un substrat prébiotique à une souche probiotique du genre *Bacillus*, seront d'abord abordés. Les résultats relatifs à l'étude de la relation structure-activité des acides lipotéichoïques de trois *Bacilli* probiotiques seront présentés dans un deuxième temps. Enfin, des perspectives d'étude seront proposées pour chacune des deux parties avant de conclure sur l'ensemble du travail de thèse.

Partie A

Etude Bibliographique

Plan de la partie :

Le microbiote intestinal

1. Généralités
2. Développement du microbiote intestinal
3. Rôles physiologiques de la flore intestinale
4. Pathologies associées au microbiote intestinal
5. Modulation du microbiote et du système immunitaire intestinal

Les probiotiques

1. Historique et définitions
2. Critères de sélection d'un probiotique
3. Principaux microorganismes utilisés en tant que probiotiques
4. Le genre *Bacillus* en tant que probiotique
5. Effets des probiotiques sur la santé
6. Mécanismes d'action des probiotiques
7. Implication des entités moléculaires de la surface bactérienne dans l'interaction probiotique/hôte

Les prébiotiques

1. Historique et définition
2. Structure et obtention des prébiotiques les plus connus
3. Mode d'action des prébiotiques et effets associés

Effet des prébiotiques sur les probiotiques: concept de synbiotique

1. Définition
2. Synbiotiques commerciaux et effets sur la santé

1

LE MICROBIOTE INTESTINAL

La compréhension des effets et des mécanismes d'action des probiotiques et des prébiotiques sur la santé nécessite de connaître la structure et le fonctionnement de l'écosystème intestinal.

1. Généralités

Le corps humain héberge plus de cellules procaryotes que de cellules eucaryotes. On estime le nombre de ces cellules procaryotes à environ 10^{14} contre 10^{13} cellules eucaryotes. Ces microorganismes sont retrouvés sur la peau, les cheveux, dans la bouche, mais l'intestin est l'unique organe où est mis en place une symbiose active entre cellules eucaryotes et procaryotes. L'intestin un environnement idéal pour la microflore intestinale, appelée aujourd'hui « microbiote intestinal ». En effet, il apporte une protection aux fluctuations environnementales pour les microorganismes résidents, et il est traversé par un flux constant de nutriments issus de notre alimentation. Cet écosystème bactérien, l'un des plus peuplés de la planète, est séparé de l'intérieur de l'organisme, par un simple épithélium. Il inclut plus de 1000 espèces bactériennes, partageant un génome collectif d'environ 5 millions de gènes (Turnbaugh *et al.* 2007; Bringiotti *et al.* 2014).

Chez l'Homme, l'estomac ne renferme que peu de bactéries, tandis que leur nombre augmente progressivement du duodénum au côlon (Figure 1). En effet, dans l'iléon, le contenu dans la lumière est moins acide et les mouvements péristaltiques plus lents, favorisant ainsi une densité bactérienne plus élevée. Le côlon est quant à lui le plus gros réservoir de bactéries. Il héberge environ 10^{12} microorganismes par gramme de contenu, principalement des phyla *Firmicutes* et *Bacteroidetes* (Scaldaferri *et al.* 2012). Les mouvements péristaltiques des entérocytes sont lents et les aliments y ont un temps de séjour de 18 à 68 h (Mitsuoka 1992), permettant aux bactéries d'adhérer à la muqueuse et de croître dans le contenu luminal. Ce sont principalement des bactéries anaérobies qui résident dans cette partie du tractus, tandis que le haut de l'intestin, l'estomac et l'œsophage sont colonisés par des bactéries aérobies ou anaérobies facultatifs.

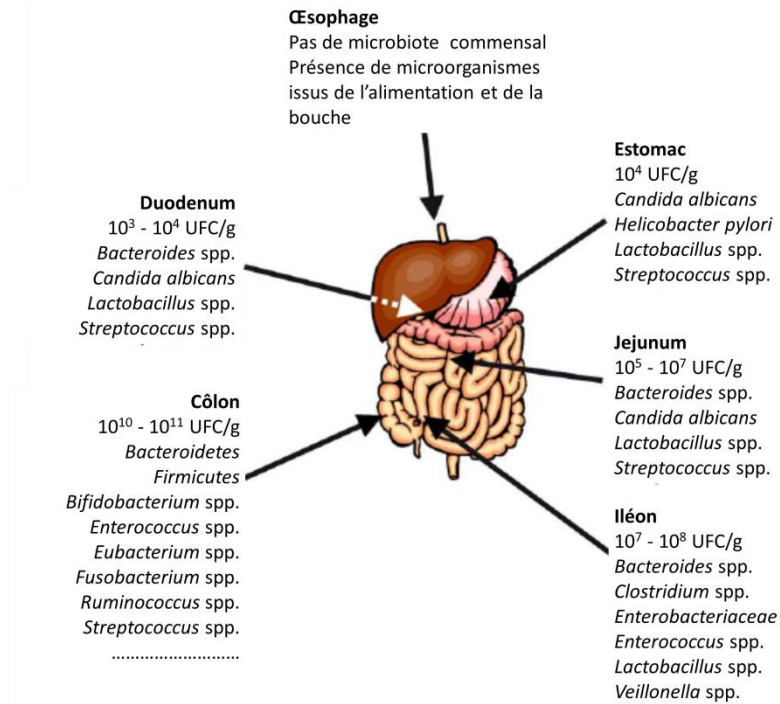


Figure 1 : Composition de la flore microbienne du tractus gastro-intestinal (adapté de (adapté de Isolauri et al. 2004).

La flore intestinale est constituée d'une flore endogène résidente, dite autochtone, et d'une flore de transit ou allochtone. La flore autochtone est présente de manière permanente dans l'écosystème intestinal, capable de coloniser des sites spécifiques et de s'y multiplier. On retrouve dans la flore allochtone les microorganismes présents dans notre environnement et qui vont traverser le tractus de manière plus ou moins lente, mais sans s'y établir définitivement.

La colonisation de l'intestin par les microorganismes est une étape clé dans la vie de l'hôte. Elle commence à la naissance, et est d'une importance cruciale dans le développement approprié des fonctions métaboliques et de défense de l'intestin.

2. Développement du microbiote intestinal

A la naissance, le tube digestif humain est dans la majorité des cas un environnement stérile, et l'acquisition de notre microbiote fait partie intégrante de notre développement (DiGiulio et al. 2008)., la première colonisation de l'intestin commence lors de l'accouchement par des bactéries maternelles et environnementales, puis du premier repas (Jiménez et al. 2008). Lorsqu'il naît, l'enfant est exposé à une grande diversité de microbes, la plupart provenant du canal d'accouchement de la mère. Le

microbiote intestinal de l'enfant est modelé par le microbiote vaginal de la mère, plus que par le microbiote intestinal (Dominguez-Bello *et al.* 2010), tandis que les similarités de composition entre le microbiote intestinal de la mère et celui de l'enfant vont augmenter avec l'âge (Yatsunenکو *et al.* 2012) comme représenté Figure 2 :

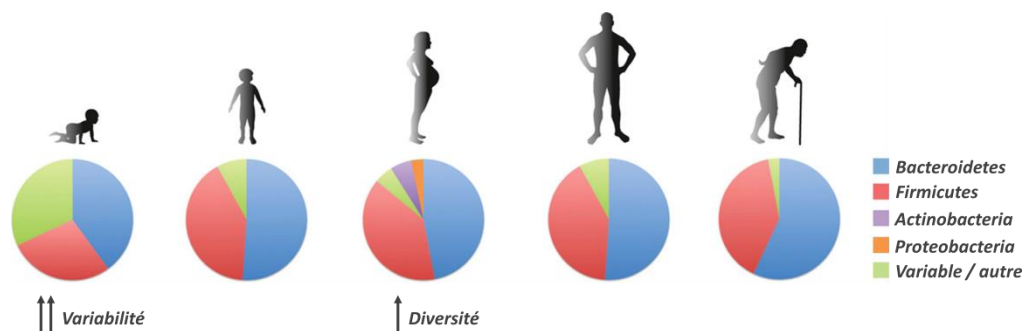


Figure 2 : Structure du microbiote humain à travers les cycles de la vie (d'après Kostic *et al.* 2013)

La future composition du microbiote du nouveau-né sera fortement influencée par le mode d'accouchement. En effet, la communauté bactérienne présente chez un enfant né par césarienne sera semblable à celle présente sur la peau de la mère avec une majorité de *Staphylococcus* et de *Propionibacterium* spp. Dans le cas d'une naissance par voie basse, le microbiote de l'enfant sera majoritairement composé de souches de *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Atopobium* et *Sneathia* spp., retrouvées dans la flore vaginale de la mère (Dominguez-Bello *et al.* 2010).

La structure de ce premier microbiote sera également fortement dépendante de l'alimentation (allaitement au sein ou du lait maternel artificiel). Le lait maternel contient un pourcentage important d'oligosaccharides non-digestibles qui pourront servir de substrat à la flore qui conduira à la production d'acides-gras à chaînes courtes. Ces derniers vont favoriser l'implantation des genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, considérées comme « bactéries bénéfiques pour la santé », et retarder l'implantation des genres *Clostridium* et *Bacteroides*. En revanche, chez l'enfant nourri par lait maternisé, la composition de la flore deviendra similaire à celle de l'enfant nourri par lait maternel qu'une fois la diversification alimentaire mise en place (Fanaro *et al.* 2003).

Enfin, le niveau d'hygiène joue un rôle clé dans le développement du microbiote intestinal (Nieuwdorp *et al.* 2014). La composition de ce dernier diffère selon que l'enfant est né dans un pays développé ou dans un pays en développement, et il diverge également selon que l'enfant ait été élevé dans un milieu rural ou urbain (Rook *et al.* 2014).

A la suite de cette première colonisation, la maturation du microbiote se traduit par une augmentation de la diversité et de la stabilité de la communauté microbienne (Figure 2). Cette communauté va subir plusieurs modifications consécutives jusqu'à atteindre un équilibre « optimal » (Lozupone *et al.* 2012). D'importantes fluctuations dans la composition du microbiote apparaissent dans les premières semaines, avec souvent la domination d'un seul groupe taxonomique, puis les populations deviennent plus stables dans le temps. Les microbiotes des enfants vont, par la suite, évoluer vers des profils plus similaires les uns des autres, et similaires également aux microbiotes adultes, ce qui suggère que les communautés microbiennes convergent vers un microbiote adulte « générique » après 1 an. Ce microbiote « générique » est caractérisé par une population dominante de *Bacteroidetes* et *Firmicutes*, et une faible population de *Proteobacteria* et d'autres bactéries à Gram négatif (Kostic *et al.* 2013).

Des programmes de séquençage à grande échelle du microbiote humain comme le « Human Microbiome Project » financé par le National Institute of Health (USA), ou encore le « Meta HIT »¹ financé par la Commission Européenne doivent permettre à long terme de comprendre les fonctions de la flore commensale sur la santé, et le rôle plus spécifique de chacune des espèces bactériennes qui la compose. Ces études ont pour objectif de valider une hypothèse souvent proposée aujourd'hui, qui suggère qu'un « microbiote malade » peut être associé à une pathologie ou à un syndrome métabolique, laissant espérer qu'une modification du microbiote vers une composition microbienne « saine » puisse prévenir ces pathologies.

2.1. Structures et fonctions de la muqueuse intestinale et des tissus lymphoïdes associés

2.1.1. Structure de la barrière intestinale

Avec la colonisation par le microbiote, le tractus digestif a élaboré un système de « barrière » le séparant de l'environnement extérieur, et le protégeant de l'invasion et de la dissémination des microorganismes dans les sous-couches de l'épithélium intestinal (Yu *et al.* 2012). Le confinement de la flore commensale est assuré par la muqueuse intestinale et une couche de mucus, jouant ensemble un rôle de barrière physique. Le mucus est un fluide visqueux composé de mucine, des glycoprotéines sécrétées par les cellules caliciformes (Corfield 2014), de peptides antimicrobiens non-spécifiques jouant le rôle de barrière chimique (De Smet et Contreras 2005) et d'immunoglobulines A sécrétées (sIgA) assurant la fonction de barrière immunitaire (Weng et Walker 2013). La barrière intestinale est une membrane continue, formée par une monocouche de cellules épithéliales liées entre elles par des

¹ Metagenomics of the Human Intestinal Tract

jonctions serrées (Shen et Turner 2006). Ces cellules, aussi appelées entérocytes, possèdent à leur surface des microvillosités qui créent une bordure en brosse à la surface extérieure de l'épithélium, empêchant l'invasion microbienne et augmentant la surface d'absorption des nutriments (Figure 3).

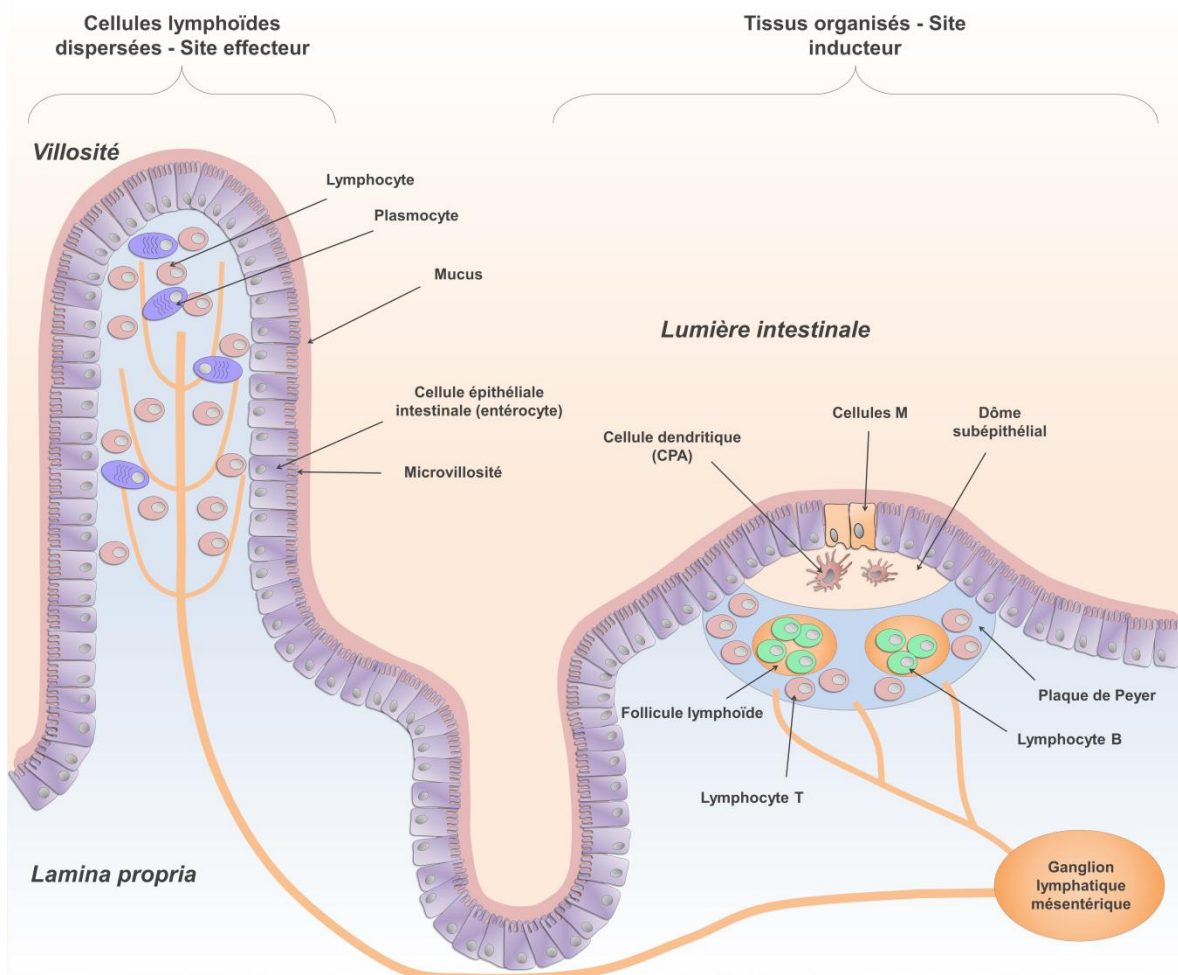


Figure 3: Représentation schématique de la barrière intestinale et des tissus lymphoïdes associés (adapté de Mowat (2003) et de Weng (2013)).

2.1.2. Structure des tissus lymphoïdes associés à l'épithélium

Les bactéries commensales sont constamment en contact avec les cellules de l'épithélium, suggérant que le système immunitaire est capable de différencier la flore commensale de la flore pathogène, et de réguler son activité au niveau de la muqueuse afin de maintenir un équilibre entre tolérance et défense. L'influence basale du microbiote sur l'homéostasie de l'intestin, couplée à une reconnaissance rapide des pathogènes, demande au système immunitaire de « sonder » en permanence le contenu de la lumière intestinale. Pour cela, l'organisme a mis en place des sites inducteurs avec des structures spécialisées, permettant de détecter les antigènes présents dans la lumière, malgré les

contraintes physiques de la barrière intestinale (Mowat 2003). Ces structures comprennent à la fois des médiateurs cellulaires de l'immunité innée¹, mais également de l'immunité adaptative².

Le premier mode de capture des antigènes est réalisé par des structures lymphoïdes spécialisées, appelées plaques de Peyer (Figure 4), qui sont réparties sur toute la longueur du tractus intestinal (Hamada *et al.* 2002). Ce sont ces sites qui vont contribuer principalement au maintien de l'équilibre entre immunité et tolérance à la surface de la muqueuse. Cet épithélium, qui recouvre les plaques de Peyer, contient des cellules spécialisées, appelées cellules M (pour « Microfold »). Celles-ci ont la capacité « d'échantillonner » les antigènes présents dans la lumière intestinale et de les délivrer au reste du système par transcytose³ (Kerneis *et al.* 1997; Debard *et al.* 1999). Bien que ce système soit un site de défense immunitaire des muqueuses, c'est également un site stratégique pour l'entrée des microorganismes pathogènes (Artis 2008). Sous l'épithélium intestinal, on trouve la *lamina propria*, une structure riche en cellules présentatrices d'antigènes, appelées cellules dendritiques (DC), et en lymphocytes B et T immatures (Figure 3), spécialisés dans la réponse immunitaire adaptative (Mowat 2003; Coombes et Maloy 2007). Après avoir traversé l'épithélium, l'antigène est capturé par les cellules dendritiques qui vont migrer vers les zones contenant les lymphocytes non-différenciés au niveau des plaques de Peyer (Figure 4).

Le deuxième mode de capture dépend de cellules dendritiques intestinales spécialisées et localisées dans la *lamina propria* (Figure 4). Elles possèdent des appendices, appelées dendrites, qui sont projetées entre les cellules épithéliales pour être exposées aux éléments présents dans la lumière intestinale et échantillonner directement le microenvironnement luminal (Rescigno *et al.* 2001). Les cellules dendritiques reconnaissent efficacement les antigènes du lumen grâce à l'expression d'un grand nombre de récepteurs spécialisés dans la reconnaissance microbienne appelés Pattern-Recognition Receptors (ou PRR). Ces derniers incluent les récepteurs Toll-like (TLR), capables de reconnaître les motifs moléculaires associés aux microbes (microbe associated molecular pattern ou MAMP).

¹ L'immunité innée consiste en une série de mécanismes permettant à l'organisme de se protéger contre les agents infectieux de façon immédiate.

² L'immunité adaptative a le même objectif que l'immunité innée. Sa mise en place est plus lente, mais elle est plus efficace car plus spécifique, avec un effet « mémoire » durable.

³ Actions combinées d'une endocytose du côté lumière intestinale, et d'une exocytose du côté *lamina propria* permettant à un composé de traverser une cellule de part en part.

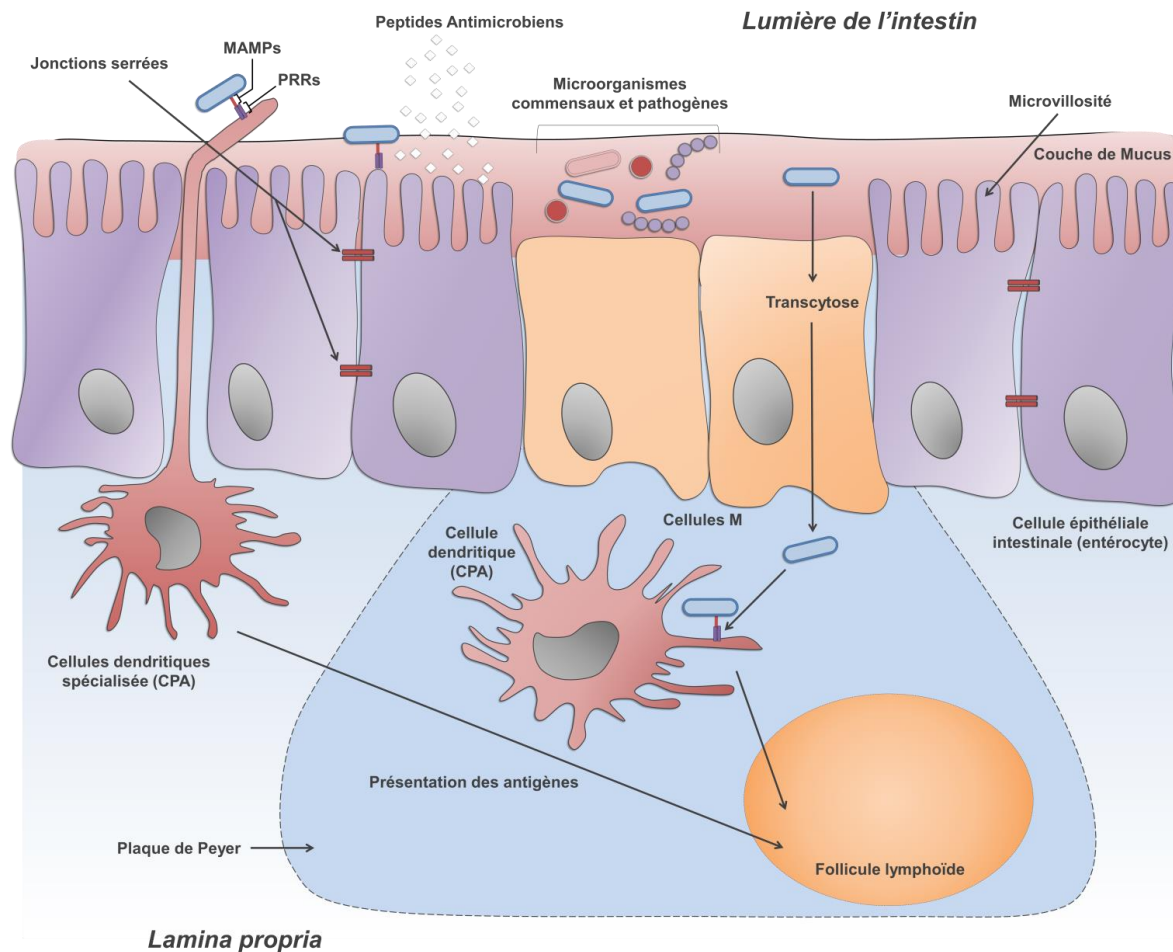


Figure 4 : Représentation schématique des différents modes de capture des antigènes par la muqueuse intestinale (adapté de Artis (2008) et de Lebeer (2010)).

2.1.3. Induction d'une réponse immunitaire intestinale

De manière générale, la liaison d'un antigène avec les TLRs des entérocytes et des cellules dendritiques, conduit à l'activation de la réponse immunitaire innée. Cela se traduit par la production de peptides antimicrobiens et l'expression de cytokines pro-inflammatoires qui stimulent l'afflux et l'activation d'autres cellules inflammatoires comme les monocytes qui peuvent se différencier en neutrophiles. L'activation de la réponse immunitaire innée par les cellules dendritiques va également générer des cytokines qui jouent également un rôle prépondérant dans la mise en place de la réponse immune adaptative.

En effet, après capture de l'antigène par les cellules dendritiques, ces dernières vont migrer vers les lymphocytes immatures, présents au niveau des plaques de Peyer (Figure 4). Les cellules

dendritiques vont présenter les peptides antigéniques et ainsi activer les lymphocytes. Les lymphocytes qui ont été activés dans les plaques de Peyer vont alors migrer vers les ganglions lymphatiques mésentériques où ils resteront jusqu'à leur différenciation (Butcher *et al.* 1999). Une fois différenciés, ils retournent vers les sites effecteurs de la muqueuse (Figure 3) où ils seront redistribués dans des compartiments distincts.

Les lymphocytes T sont les lymphocytes retrouvés majoritairement dans la *lamina propria* de l'intestin (Reséndiz-Albor *et al.* 2005). Ces cellules ont la capacité de réagir très rapidement aux signaux reçus de la lumière intestinale. Elles sont capables d'initier à la fois des réponses pro- ou anti-inflammatoires (McDermott et Huffnagle 2014). La liaison de l'antigène aux récepteurs spécifiques des lymphocytes T va conduire une partie de ces cellules à leur maturation en lymphocytes T effecteurs, capables de sécréter des cytokines et de réguler les réponses immunes associées. Les autres cellules T resteront à l'état de « cellules mémoires » afin de déclencher la réponse immunitaire adaptative dans le cas où le même antigène serait à nouveau rencontré.

L'activation des lymphocytes B va entraîner leur différenciation en plasmocytes capables de produire des IgA sécrétoires spécifiques des antigènes bactériens (Macpherson et Uhr 2004). La production d'IgA est modulée par des facteurs cellulaires produits par les cellules dendritiques et les lymphocytes T activés comme le TGF- β et l'IL-10 (Mestecky *et al.* 2005). Les IgA sont transportées vers la muqueuse où elles traverseront la barrière intestinale par transcytose via les cellules M. Une fois dans la lumière de l'intestin, elles pourront se fixer spécifiquement à un antigène bactérien, inhibant ainsi l'adhésion de la bactérie à la surface des entérocytes. Elles serviront également à l'opsonisation des antigènes ayant franchi la barrière intestinale, afin de les éliminer de l'organisme.

La capacité collective des cellules épithéliales intestinales et des cellules dendritiques spécialisées à pouvoir sonder directement le contenu luminal et à reconnaître les microorganismes via les PRRs nécessite néanmoins que l'organisme puisse distinguer les bactéries commensales des bactéries pathogènes. Nous venons de voir qu'en théorie, ce sont les mêmes PRRs qui assurent la reconnaissance des bactéries commensales et pathogènes, et que les MAMPs exprimés à leur surface ont des structures similaires. Sansonetti (2010) rapporte que trois hypothèses principales formulées dans la littérature concernant les mécanismes de distinction entre bactéries commensales et pathogènes : (i) soit les MAMPs des microorganismes symbiotiques subissent des modifications chimiques particulières qui les rendent « furtifs » ou tolérés par les PRRs, (ii) ou bien ces mêmes microorganismes expriment des effecteurs spécialisés qui induisent des signaux de tolérance chez les cellules de l'hôte, (iii) ou enfin, ce sont les pathogènes eux-mêmes qui créent, en plus de leur détection par les PRRs, un niveau de stress qui est perçu par l'hôte comme un signal de danger, entraînant ainsi sa réponse vers l'inflammation avec pour conséquence l'éradication du microorganisme.

3. Rôles physiologiques du microbiote intestinal

Les effets bénéfiques des microorganismes que nous hébergeons n'ont commencés à être observés que récemment (O'Hara et Shanahan 2006). Bien que mal connue à ce jour, il existerait une forme de communication très importante entre le microbiote, l'épithélium du tractus et les tissus lymphoïdes associés. Ce « triologue » assure la génération et le maintien d'une relation symbiotique stable entre l'intestin et les bactéries qui le colonisent. Ces dernières sont à l'origine de nombreuses fonctions métaboliques et de protection, et sont impliquées dans de nombreux mécanismes de développement du système immunitaire de l'intestin.

3.1. Fonctions métaboliques et nutritionnelles

Les microorganismes du tractus intestinal ont des fonctions métaboliques très vastes et indispensables à la transformation des composés alimentaires.

Les glucides sont des sources énergétiques indispensables, aussi bien pour les humains que les cellules microbiennes. Les enzymes humaines ne dégradent pas les glucides les plus complexes, seuls les oses simples sont absorbés au niveau de l'intestin. Les polysaccharides, comme la cellulose, les xylanes, ou l'amidon, sont fermentés dans le côlon par le microbiote afin de produire de l'énergie pour la croissance bactérienne. Certaines espèces bactériennes contiennent beaucoup plus de gènes codant des glucosidases qu'il en a été identifiés dans le génome humain, expliquant leur capacité à dégrader des structures osidiques très différentes (Xu *et al.* 2003).

Au-delà de l'intérêt que représente la flore intestinale pour sa participation à la digestion, les produits des fermentations bactériennes comme les acides gras à chaînes courtes (AGCCs) exercent des effets bénéfiques sur la santé de l'organisme commensal. Parmi les AGCCs produits, le butyrate est particulièrement important en tant que substrat énergétique dans le métabolisme cellulaire de l'épithélium du côlon (Donohoe *et al.* 2011). Deux autres AGCCs, l'acétate et le propionate, sont utilisés comme substrats par le foie pour la lipogenèse et la néoglucogenèse. Les AGCCs participent également à la modulation de la réponse immunitaire, en réduisant la perméabilité intestinale et par conséquent l'interaction entre les antigènes bactériens et les cellules de l'hôte (Tremaroli et Bäckhed 2012).

Le microbiote permet également d'éliminer la bile sécrétée, qui n'est pas réabsorbée par l'intestin. Le foie produit chaque jour une grande quantité de sels biliaires à partir du cholestérol, dont environ 5 % ne sont pas réabsorbés dans l'iléon. Ils sont conjugués à la glycine ou à la taurine par une

liaison amide aboutissant à la formation d'acides choliques et chénodésoxycholiques, acides biliaires primaires (Salen et Shefer 1983). Une fois arrivés dans le côlon, ils sont déconjugés par les enzymes bactériennes, conduisant à la formation d'acides biliaires secondaires, avant d'être excrétés dans les selles (Macfarlane et Macfarlane 1997).

Enfin, le microbiote intestinal participe activement à la synthèse des vitamines B et K (LeBlanc *et al.* 2013) et à l'absorption d'ions minéraux tels que le magnésium, le calcium et le fer (Scholz-Ahrens *et al.* 2007).

3.2. Fonctions de protection

La présence de bactéries commensales protège l'intestin de la colonisation par des bactéries pathogènes en entrant en compétition pour les nutriments et les récepteurs (Jankowska *et al.* 2008; Leatham *et al.* 2009), mais également en produisant des molécules antimicrobiennes (Lu *et al.* 2009). En effet, sa fonction de protection résulte également de la synthèse de molécules spécifiques appelées bactériocines. De plus, l'exposition des entérocytes aux bactéries présentes dans la lumière intestinale entraîne une augmentation de la production de peptides antimicrobiens par les cellules de l'épithélium intestinal, limitant ainsi la pénétration des microorganismes dans les tissus lymphoïdes associés à la muqueuse (Su *et al.* 2013).

Les bactéries du microbiote vont également pouvoir utiliser la mucine sécrétée comme source énergétique, ce qui favorise leur implantation au niveau de l'intestin et limite l'invasion par des pathogènes (McGuckin *et al.* 2011). Mais la présence de bactéries commensales peut à son tour augmenter la production de mucine, permettant un renouvellement plus rapide de la flore intestinale et une exposition moindre aux pathogènes (Deplancke et Gaskins 2001).

Le microbiote intestinal est également impliqué dans le maintien des fonctions de structure. Les microorganismes, au contact des cellules de la muqueuse, peuvent induire l'augmentation de la prolifération des entérocytes et le renforcement de l'intégrité de l'épithélium, par la surexpression de gènes impliqués dans la maturation de l'épithélium intestinal, le maintien des jonctions serrées, et la vascularisation des villosités (Stappenbeck *et al.* 2002).

3.3. Fonctions immunitaires

Les microorganismes commensaux sont impliqués dans le développement des organes des mammifères, notamment les os, le cerveau, le tractus gastro-intestinal et le système immunitaire (McFall-Ngai *et al.* 2013).

A la naissance, certaines fonctions du système immunitaire sont déjà héritées génétiquement, mais le développement de ces fonctions nécessite une exposition aux microbes présents dans l'environnement (Rook *et al.* 2014). L'exposition à une large diversité d'organismes permet au système immunitaire de « garder en mémoire » ces différentes structures moléculaires. Cela aura pour effet d'accélérer la reconnaissance de nouveaux organismes pathogènes (Su *et al.* 2013). La colonisation microbienne a une importance cruciale dans les développements des tissus lymphoïdes et du système immunitaire intestinal (Hooper *et al.* 2012). Ce dernier reste très largement sous développé en absence de stimulation microbienne (Hooper 2004). Par exemple, chez des souris axéniques, c'est-à-dire dépourvues de flore intestinale, la production de peptides antimicrobiens et le nombre de lymphocytes dans la *lamina propria* sont très faibles (Bandeira *et al.* 1990; Hooper 2004). Les plaques de Peyer chez ces animaux sont moins actives, avec moins de plasmocytes producteurs d'IgA (Crabbe *et al.* 1968). En revanche, une stimulation microbienne va permettre de restaurer l'organisation du système immunitaire chez ces souris (Umesaki *et al.* 1993; McDermott et Huffnagle 2014).

Les effets du microbiote sur le système immunitaire intestinal ne se limitent pas à des interactions directes entre MAMP et récepteurs de l'hôte. La composition et l'activité métabolique du microbiote intestinal exercent une influence considérable sur la régulation immunitaire. Les métabolites, comme les AGCCs, produits lors des fermentations par le microbiote jouent également un rôle important dans la modulation de l'activité immunologique de l'hôte. Saemann et coll. (2000) et Cavaglieri et coll. (2003) ont montré que le butyrate possède des propriétés anti-inflammatoires sur des cellules lymphoïdes en culture *in vitro*. Les propriétés anti-inflammatoires de l'AGCCs sur des cellules dendritiques et des macrophages humains pourraient provenir de sa capacité à inhiber la production d'IL-12, et à bloquer la translocation nucléaire de NF- κ B, un facteur important impliqué dans les phénomènes inflammatoires (Millard *et al.* 2002; Säemann *et al.* 2002).

Dans des conditions physiologiques normales, il existe une interaction entre les bactéries intestinales et l'hôte humain, participant au maintien de l'intégrité du système immunitaire dans les conditions normales et pathologiques. Mais un déséquilibre, qu'il se manifeste au sein même du microbiote, ou bien entre le microbiote et le système immunitaire de l'hôte, serait à l'origine de plusieurs pathologies intestinales, et même parfois systémiques.

4. Pathologies associées au microbiote intestinal

L'évolution des conditions de vie dans les pays industrialisés pourrait être la principale origine de l'apparition de nouvelles pathologies immunitaires, comme les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) ou les allergies.

La « théorie de l'hygiène » est un terme utilisé pour qualifier le fait que l'augmentation des conditions de vie de plus en plus aseptiques limite la rencontre avec les microorganismes de l'environnement qui modulent notre système immunitaire, notamment au cours de l'enfance. Ce terme était à la base utilisé dans le cas de désordres allergiques, pour lesquels le système immunitaire répond de manière excessive lors de la rencontre avec un antigène inoffensif. Mais en fait, il pourrait également concerner les infections de l'enfance, des maladies auto-immunes et des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Aujourd'hui, Rook lui a donné une autre appellation, plus moderne, la « théorie des vieux amis » (Rook 2010). Nous avons vu précédemment le rôle fondamental du microbiote dans le développement des fonctions immunitaires. Si dans les premières semaines de sa vie un enfant ne rencontre pas les microorganismes appropriés à son développement, cela pourrait conduire à un mauvais développement de son immunité. De plus, l'exposition à une large diversité de microorganismes permet au système immunitaire de se construire une « mémoire » de différentes structures moléculaires microbiennes, ce qui va accélérer la reconnaissance lors de la rencontre avec un nouvel antigène potentiellement préjudiciable pour la santé (Rook 2013). Et enfin, les composants microbiens comme le LPS, le peptidoglycane ou les LTAs, lorsqu'ils entrent en contact avec la muqueuse du tractus intestinal, maintiennent un seuil d'activation de l'immunité innée (Lebeer *et al.* 2010). L'ensemble de ces interactions entre les microorganismes de l'environnement et le système immunitaire, permet « d'éduquer » ce dernier (Figure 5).

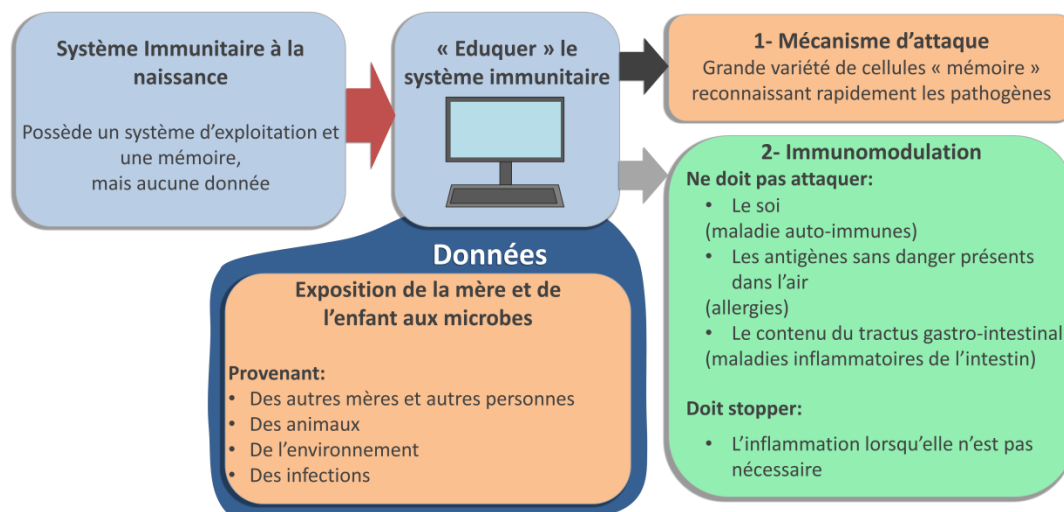


Figure 5 : Représentation schématique de "l'éducation" du système immunitaire nécessaire à son développement (modifié de Rook *et al.* 2014).

L'organisme a besoin de développer un réseau de voies de régulation par l'intermédiaire des lymphocytes T régulateurs, qui peuvent arrêter ou limiter une réponse inappropriée contre le soi, contre des antigènes inoffensifs ou encore contre le contenu du tractus (incluant la flore commensale). Ce sont ces mécanismes de défense qui sont à l'origine de pathologies telles que les maladies auto-immunes, les allergies et les maladies inflammatoires de l'intestin, dont la prévalence est en augmentation dans les pays développés (Rook *et al.* 2014). Il est possible que ces réactions de l'organisme face à la population microbienne façonnent sa composition, et puissent être à l'origine de dysbioses intestinales.

La dysbiose intestinale est un déséquilibre de la flore microbienne intestinale, pouvant conduire à un mauvais développement et fonctionnement de l'intestin. Il reste cependant difficile d'affirmer si la dysbiose est la cause ou la conséquence d'un mauvais fonctionnement intestinal. En effet, la population des bactéries commensales diffère entre les sujets en bonne santé et les patients atteints de pathologies intestinales, comme dans le cas des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Mais il ne serait pas anormal de penser que les conditions de vie dans les pays industrialisés soient à l'origine de déséquilibres de la flore intestinale, ce dernier pouvant ensuite conduire à l'apparition de pathologies plus graves comme la maladie de Crohn. Les changements environnementaux (pollution accrue, ...) associés aux modes de vie occidentaux, incluant les modifications de régime alimentaire, ou encore l'utilisation d'antibiotiques et d'autres médicaments, pourraient participer à l'établissement des dysbioses.

Aujourd'hui, la dysbiose intestinale est associée aux maladies inflammatoires et aux syndromes métaboliques notamment (Ha 2011).

4.1. Syndrome métabolique

Le nombre de personnes atteintes par des syndromes métaboliques, comme l'obésité et le diabète, est en constante augmentation dans les pays développés. L'obésité est un syndrome multifactoriel qui peut être, entre autres, le résultat d'une consommation énergétique excessive par rapport à la dépense. Le microbiote intestinal joue un rôle important en affectant l'homéostasie énergétique. Plus précisément, il coopère avec les cellules du tractus intestinal afin de contrôler le stockage et la dépense énergétique. La transplantation du microbiote intestinal d'une souris obèse chez une souris axénique conduit à une augmentation de la masse adipeuse par rapport à une souris dont le tractus est colonisé par le microbiote d'un animal témoin « sain » (Turnbaugh *et al.* 2006). Des différences majeures de la composition du microbiote sont à l'origine de ces observations. Ces changements suggèrent que la « manipulation » de la communauté microbienne intestinale pourrait aider à réguler l'équilibre énergétique chez les personnes obèses. D'autres recherches ont révélé que les communautés microbiennes intestinales, chez les personnes obèses, sont plus efficaces dans l'extraction et le stockage de l'énergie d'un régime donné comparativement à celles des individus « maigres » (Turnbaugh *et al.* 2006).

4.2. Allergies

Les allergies sont des réactions excessives du système immunitaire contre un antigène « inoffensif » non-toléré par l'organisme. L'inflammation observée dans une réaction allergique, orchestrée par les lymphocytes Th2, se caractérise par la production d'anticorps IgE spécifiques de l'allergène, et par l'afflux de lymphocytes T et d'autres cellules effectrices au niveau du site d'exposition à l'allergène. Les cellules Th2, comme les cellules Th1, sont placées sous le contrôle de lymphocytes T régulateurs (Treg), qui régulent l'équilibre entre la réponse inflammatoire (Th1) ou la réponse allergique (Th2). Il est capital que l'équilibre entre Th1, Th2 et Treg soit maintenu pour la mise en place d'une tolérance envers des antigènes inoffensifs, et l'inhibition de l'inflammation allergique de type Th2 (Kalliomäki 2009).

La présence d'un grand nombre de cellules immunitaires au niveau de l'intestin suggère que le microbiote intestinal pourrait jouer un rôle fondamental dans la régulation des réponses immunitaires associées aux phénomènes allergiques (Purchiaroni *et al.* 2013). L'interaction des bactéries de la lumière intestinale avec les cellules dendritiques peut réguler la balance Th1/Th2. Des dysfonctionnements de ces mécanismes qui pourraient être à l'origine des réponses immunitaires inappropriées observées dans le cas d'allergies. À ce jour, il n'y a aucun genre bactérien ou de sous-ensembles de la flore systématiquement associés à des maladies résultant d'allergies. En revanche,

l'apparition de ces pathologies serait clairement à associer à la théorie de l'hygiène. La prévalence de maladies telles que l'eczéma, les allergies alimentaires, le rhume des foins et l'asthme a augmenté dans le monde entier au cours des 40 dernières années, en particulier dans les pays occidentaux et chez les enfants (Romagnani 2007).

4.3. Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

La maladie de Crohn et la rectocolite ulcéro-hémorragique (RCUH) sont des affections inflammatoires des voies digestives. Elles représentent ensemble un spectre de maladies appelées maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). La maladie de Crohn peut atteindre toutes les parties des voies digestives, de la bouche à l'anus, de façon discontinue avec des altérations inflammatoires atteignant toutes les couches de la paroi intestinale. La zone la plus fréquemment atteinte est l'iléon terminal. La RCUH atteint le rectum et peut s'étendre de façon proximale sur diverses longueurs jusqu'à l'atteinte de la totalité du côlon. Un saignement rectal, une diarrhée et des douleurs abdominales en sont les caractéristiques principales.

Plusieurs facteurs contribuent probablement au développement de MICI, incluant des changements dans la composition du microbiote intestinal, des réactions anormales du système immunitaire, et des facteurs génétiques. La population du microbiote est clairement différente entre les sujets en bonne santé et les patients atteints de MICI. Néanmoins, on ne sait pas si ces modifications représentent un phénomène primaire dans lequel les bactéries joueraient un rôle dans l'évolution des MICI, ou bien si elles constituent un phénomène secondaire dans lequel une dérégulation immunitaire ou une inflammation entraînerait des modifications de la composition du microbiote. Qu'il s'agisse d'un phénomène primaire ou secondaire, la différence entre les populations de bactéries commensales étant constante, cela suggère que le microbiote joue un rôle dans la pathogénie des MICI (Chermesh et Shamir 2009).

5. Modulation du microbiote et du système immunitaire intestinal

Face à l'augmentation de ces pathologies, principalement dans les pays développés, la communauté scientifique s'est intéressée aux possibilités de modification de la composition du microbiote intestinal, et à la modulation du système immunitaire associé. L'objectif était de modifier la composition de la microflore intestinale, c'est-à-dire partir d'une composition qualifiée de

« potentiellement dangereuse » vers une microflore qui serait « bénéfique » pour l'hôte. Cela se traduirait par une diminution du nombre de coliformes et de clostridies, et une augmentation des lactobacilles et/ou des bifidobactéries par exemple (Ouwehand *et al.* 2002). En raison de la concurrence pour les sites d'adhésion et pour les nutriments, ainsi que de la production de substances antimicrobiennes, les niveaux de certains genres moins désirables peuvent diminuer. Cela sous-entend également que l'interaction entre les bactéries du microbiote et les cellules de la muqueuse intestinale serait alors modifiée, pouvant conduire à la modulation des tissus lymphoïdes associés et du système immunitaire local et systémique. Ce sont ces hypothèses qui sont à la base du concept de probiotique.

2

LES PROBIOTIQUES

1. Historique et définitions

Ilya Ilyich Metchnikoff, Prix Nobel de Médecine en 1908 récompensé pour ses travaux sur la découverte de la phagocytose, propose une théorie selon laquelle l'espérance de vie pourrait être augmentée en manipulant le microbiote intestinal grâce aux bactéries trouvées dans le lait fermenté. Cette théorie repose sur des observations faites en Europe de l'Est, où une part importante de la population vie au-delà de 100 ans, alors que les conditions de vie sont très modestes, et les styles de vie extrêmement simples dans les années 1900 (Colarelli 2010). En revanche, les habitants, qui sont pour la plupart des paysans, ont un mode de vie très sain : ils vivent dans un environnement paisible où ils travaillent, font de l'exercice, dorment 6 à 7 h par nuit puis mangent et boivent sainement. Ils sont également de très importants consommateurs de produits à base de lait fermenté, dans lesquels Metchnikoff a identifié deux bactéries : *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*. Il s'interroge sur le rôle potentiel de cet aliment enrichi en microorganismes dans l'espérance de vie des consommateurs. Il suggère une incidence de l'alimentation sur la composition de la flore intestinale, ce qui rendrait possible l'implantation de « microbes utiles au détriment de microbes dangereux » (Vasiljevic et Shah 2008; Mackowiak 2013).

En France et à la même époque, le pédiatre Henry Tissier remarque que les bactéries identifiées dans les selles d'enfants sains présentent une morphologie en Y, et que le nombre de ces bactéries diminue dans les selles d'enfants atteints de diarrhées. Il suggère alors d'administrer de telles bactéries à des enfants atteints de diarrhées afin de restaurer leur flore intestinale.

Mais c'est probablement Vergio en 1954 qui a été le premier à associer ce concept au terme « probiotique » dans un article intitulé « Anti- und Probiotika » (Holzapfel et Schillinger 2002). Le terme « probiotique » vient du Grec qui signifie « pour la vie », choisi par opposition au terme antibiotique. Dans les années 1950-1960, de nombreux produits « probiotiques » ont été développés, mais l'absence de données rigoureuses sur l'effet clinique a conduit à leur disparition progressive, à l'exception de quelques-uns dont les effets ont été confirmés. Jusqu'en 2002, de nombreuses définitions du terme « probiotique » vont se succéder, soulignant les effets bénéfiques sur le microbiote intestinal, si les quantités ingérées sont optimales. Contrairement aux hypothèses

initialement proposées, les effets bénéfiques associés à leur consommation ne nécessite pas nécessairement une modification de la flore intestinale, notamment les effets immunomodulateurs (Rimbaud *et al.* 2004).

En 2002, la « Food and Agriculture Organization of the United Nations » et la « World Health Organization » (FAO / WHO) proposent une définition officielle du terme « probiotiques » : « Organismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité adéquate, peuvent exercer des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte » (FAO/WHO 2002).

2. Critères de sélection d'un probiotique

Au-delà du fait qu'une souche probiotique doit être identifiée par le séquençage de l'ARN 16S, certaines de ses propriétés physiologiques essentielles sont à prendre en considération pour s'assurer de son efficacité et du respect des règles de sécurité liées à son utilisation (d'après l'Organisation Mondiale de Gastroentérologie, 2008) :

- Innocuité de la souche : elle doit respecter le statut « GRAS » pour « Generally Recognized As Safe ». Elle ne doit pas être pathogène, mutagène ou carcinogène, et ne doit pas être résistante à certains antibiotiques,
- Tolérance aux conditions du tractus gastro-intestinal : pour assurer ses fonctions optimales, après ingestion, le probiotique doit supporter l'action de deux barrières biologiques principales que sont l'acidité gastrique et la bile sécrétée dans le duodénum,
- Adhésion à la muqueuse intestinale : l'adhésion va permettre au probiotique d'augmenter son temps de séjour dans le tractus et ainsi d'être plus intimement en contact avec les cellules intestinales,
- Capacité de croissance et activité biologique dans l'intestin : la multiplication de la souche dans l'intestin va permettre d'augmenter la taille de la population. Cela aura pour conséquence d'augmenter la concentration des produits métaboliques, et d'améliorer ses effets,
- Compatibilité avec les technologies alimentaires : la souche doit présenter une bonne stabilité technologique, notamment lors de la préparation du probiotique,
- La souche doit produire des effets bénéfiques sur la santé.

3. Principaux microorganismes utilisés en tant que probiotiques

La plupart des probiotiques en usage aujourd'hui appartiennent aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* (Hill *et al.* 2014). Ils sont non-pathogènes, non-putréfactifs, non-toxigénique et ont des propriétés saccharolytiques, ce qui permet de les considérer comme des bactéries « bénéfiques » pour la santé. Les lactobacilles sont caractérisés par leur capacité à produire de l'acide lactique et sont mis en œuvre lors de nombreuses transformations industrielles et artisanales, notamment de la viande et en fermentations laitières. Ce sont des résidents autochtones du tractus intestinal humain, et ils sont considérés comme les hôtes dominants de l'intestin grêle, tandis que le côlon est l'habitat principal des bifidobactéries. Cependant, d'autres microorganismes peuvent avoir des propriétés probiotiques. Ils comprennent des bactéries des genres *Escherichia*, *Enterococcus* ou encore *Bacillus*, ainsi que des levures comme *Saccharomyces boulardii* (Rolfe 2000; Holzapfel et Schillinger 2002). Le Tableau 1 présente les principaux microorganismes utilisés en tant que probiotiques.

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Autres
<i>L. acetotolerans</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>L. acidifarinae</i>	<i>B. asteroides</i>	<i>Bacillus clausii</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Bacillus coagulans</i>
<i>L. agilis</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
<i>L. alimentarius</i>	<i>B. boum</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>L. buchneri</i>	<i>B. breve</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. choerium</i>	<i>Escherichia coli</i> Nissle
<i>L. crispatus</i>	<i>B. coryneforme</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>B. cuniculi</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. gallicum</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>L. farciminis</i>	<i>B. gallinarum</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (levure)
<i>L. fermentum</i>	<i>B. indicum</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i> (levure)
<i>L. gasseri</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Streptococcus diacetylactis</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>
<i>L. paracasei</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus phocae</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>B. magnum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L. reuteri</i>	<i>B. merycycum</i>	<i>Stryptomycetes</i> (levure)
<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. minimum</i>	
<i>L. zymae</i>	<i>B. psuedocatenulapum</i>	
	<i>B. ruminale</i>	
	<i>B. subtile</i>	
	<i>B. thermaacidophilum</i>	

Tableau 1: Principaux probiotiques utilisés chez l'humain (modifié de Pyar *et al.*, 2013)

Aujourd'hui, les mécanismes d'action des probiotiques sont mieux compris, il ne s'agit plus de remplacer un microbiote « malade » par un microbiote « sain », avec des lactobacilles et des bifidobactéries. L'idée est de reproduire la colonisation du tractus et la stimulation qu'il devrait subir quotidiennement par les microorganismes qui nous environnent, et ainsi conduire à son développement optimal en tant qu'organe à part entière.

4. Le genre *Bacillus* en tant que probiotique

Si l'utilisation de lactobacilles et de bifidobactéries en tant que probiotiques est largement répandue, la communauté scientifique commence à s'intéresser plus intensément aux espèces du genre *Bacillus* depuis seulement quelques années (Duc *et al.* 2004), bien qu'il ait été commercialisé depuis 1958 dans le produit italien Enterogermina®. Nous avons abordé dans la première partie du manuscrit la théorie de l'hygiène, qualifiée plus récemment « théorie des vieux amis » (Rook 2010). Un nombre important de pathologies, telles que les allergies, pourraient être liées au développement des conditions de vie aseptisées des pays développés. Notre système immunitaire n'étant pas suffisamment stimulé par les microorganismes de l'environnement, nous développons des pathologies inflammatoires, résultant d'un déséquilibre entre immunité et tolérance.

Un grand nombre de microorganismes avec lesquels l'être humain co-évolue devraient être tolérés par son système immunitaire. Cela comprend bien entendu tous les microbes commensaux qui exercent des fonctions essentielles sur son développement, et contre lesquels le corps ne devrait pas se défendre (Hanski *et al.* 2012). Mais l'Homme a également évolué en tolérant des organismes inoffensifs (bactéries, archées, champignons, virus, protozoaires, ...) présent dans son environnement naturel (eau, air et sol), car ceux-ci se sont inévitablement retrouvés piégés dans le corps, en grandes quantités et à plusieurs reprises (*Bacillus cereus* par exemple). Enfin, l'Homme évolué en tolérant un ensemble d'agents infectieux spécifiques de notre passé évolutif, d'où le terme « vieux amis ». Leur caractéristique essentielle était leur capacité à persister dans de petits groupes isolés tels que les « chasseurs-cueilleurs », et ceci sans causer leur mort (*Mycobacterium tuberculosis* ou *Helicobacter pylori* par exemple) (Rook *et al.* 2014). L'ensemble de ces contacts avec des microorganismes permet « d'éduquer » le système immunitaire.

La plupart des études concernant les souches de *Bacillus* se sont intéressées à la biosynthèse d'enzyme comme les xylanases, les cellulases les amylases ou encore les protéases, largement utilisées dans l'industrie et la vie quotidienne. Ces bactéries à Gram positif présentent un intérêt en tant que probiotiques, notamment grâce à leur capacité à produire de nombreuses substances antimicrobiennes, mais surtout à leur capacité à survivre dans des conditions environnementales extrêmes sous forme de spores, contrairement au genre *Lactobacillus* (Ciffo *et al.* 1987; Cutting 2011). En effet, sous forme sporulée, le microorganisme présente une résistance accrue au pH extrême de l'estomac, ainsi qu'une meilleure aptitude à la conservation après son conditionnement. Lors de l'ingestion de spores du genre *Bacillus*, il serait possible que ces dernières interagissent avec les tissus lymphoïdes associés, notamment via leur absorption par les cellules M des plaques de Peyer, exerçant ainsi des effets immunomodulateurs (Duc *et al.* 2004).

Le genre *Bacillus* n'est pas un genre bactérien indigène de l'intestin humain. On peut l'y retrouver de façon transitoire, consécutivement à la consommation de produits provenant de l'environnement comme les légumes. Toutefois, il ne peut pas être considéré comme un résident permanent du tractus digestif, même s'il est consommé régulièrement, additionné à l'alimentation. En revanche, des études ont montré que les spores de *Bacillus* probiotique pouvaient germer dans l'intestin (Casula et Cutting 2002), favorisant son développement dans le tractus afin d'exercer ses effets bénéfiques (Duc *et al.* 2003). Cette hypothèse est soutenue par des observations déjà réalisées sur des animaux dont le tractus gastro-intestinal est très souvent colonisé par des souches de *Bacillus* (Figure 6). En effet, *Bacillus subtilis* est une bactérie souvent retrouvée dans la flore intestinale des mammifères : elle est ingérée par l'animal lors de la consommation de végétaux présents dans son environnement, avec lesquels la souche vit en symbiose. Une fois dans l'estomac, les cellules végétatives meurent tandis que les spores survivent malgré les conditions extrêmes de pH. Dans l'intestin, riche en nutriments, les spores vont pouvoir repasser sous forme végétative en quelques minutes, compte tenu des conditions nutritionnelles favorables. Elles vont ensuite se disséminer dans les tissus associés au tractus où elles seront reconnues par le système immunitaire. Les spores qui sont restées dans le lumen intestinal vont suivre le transit jusque dans le côlon. Les conditions physico-chimiques de l'environnement « cœlonique » ne sont pas favorables au développement, et ces souches de *Bacillus* vont sporuler à nouveau avant d'être excrétées (Cutting 2014).

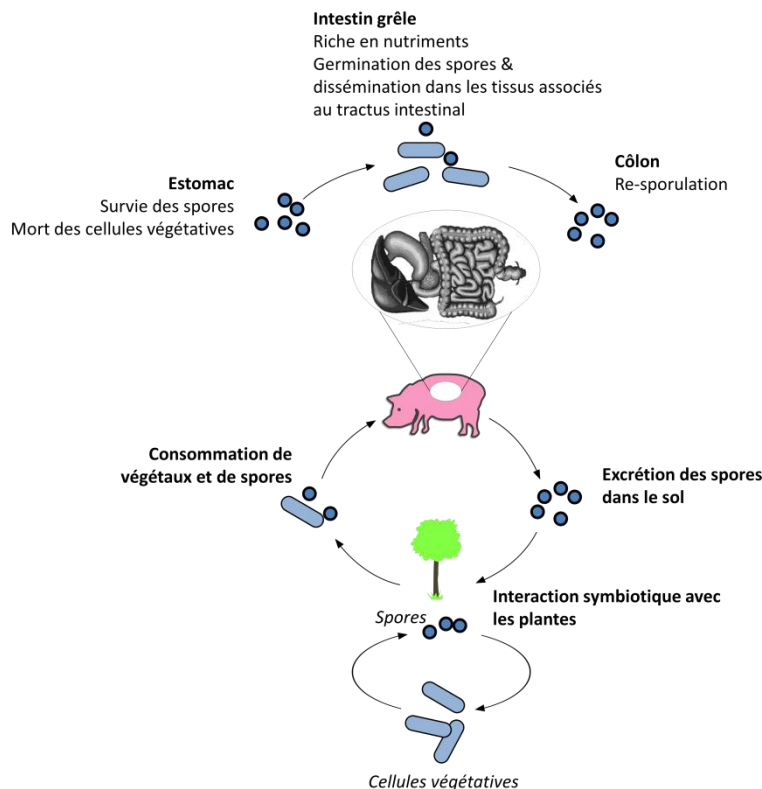


Figure 6: Cycle de vie de *Bacillus subtilis* dans l'environnement (adapté de Cutting 2014).

A titre d'exemple, une étude réalisée par Leser *et al.* (2008) sur des porcs dont l'alimentation a été supplémentée avec des spores de *Bacillus subtilis* et *Bacillus licheniformis* probiotiques, a mis en évidence que 70 à 90% des spores allaient repasser sous forme végétative dans la partie haute du tractus gastro intestinal des animaux, et ceci bien que les souches ne colonisent pas de manière définitive le tractus.

Un autre avantage des bactéries du genre *Bacillus* par rapport aux bactéries lactiques est lié à leur capacité à sécréter des sidérophores, aptes à chélater l'ion Fe^{3+} et à rendre ce dernier utilisable par les systèmes de transport actif de l'hôte (à pH = 7, l'ion Fe^{3+} est insoluble) (Patel *et al.* 2009).

Toutefois, certaines sous-espèces bactériennes du genre *Bacillus* sont responsables d'intoxications alimentaires par la production d'entérotoxines (*B. cereus* principalement), constituant un frein à leur mise en œuvre en tant que probiotiques (Patel *et al.* 2009). Le Tableau 2 regroupe les principaux produits commerciaux contenant une ou plusieurs souches de *Bacillus* (à l'exception des produits du marché Vietnamien, très nombreux, et dont les effets probiotiques restent à démontrer).

Produit	Fabriquant	Souches
Bactisubtil®	Produit par Marion Merrell, Levallois-Perret, France, mais aussi par Hoechst puis Aventis Pharma. Egalement produit par Casella-Med, Cologne, Allemagne	<i>Bacillus cereus</i> IP5832b (déposé à l'origine comme <i>Bacillus subtilis</i>)
Bio-Kult®	Protexin Health Care, Somerset, Royaume Uni	<i>B. subtilis</i>
Biosporin®	Biofarm, Ukraine	<i>Bacillus subtilis</i> 2335 <i>Bacillus licheniformis</i> 2336
Biovicerin®	Geyer Medicamentos S.A. Porto Alegre, Brésil	<i>Bacillus cereus</i> GM
Bispan®	Binex Co. Ltd., Busan, Corée du sud	<i>Bacillus polyfermenticus</i> SCD
Domuvar	BioProgress SpA, Anagni, Italie	<i>Bacillus clausii</i> (déposé à l'origine comme <i>Bacillus subtilis</i>)
Enterogermina®	Sanofi Synthelabo SpA, Milan, Italie	<i>Bacillus clausii</i> O/C <i>Bacillus clausii</i> N/R <i>Bacillus clausii</i> T <i>Bacillus clausii</i> SIN
Sustenex®	Ganeden Biotech Inc., Ohio, USA	<i>Bacillus coagulans</i> GanedenBC ³⁰
Lactipan Plus	Istituto Biochimico Italiano SpA, Milan, Italie	Commercialisé en tant que <i>Lactobacillus sporogenes</i> mais contenant <i>Bacillus subtilis</i>
Lactospore	Sabinsa Corp., Piscataway, USA	Commercialisé en tant que <i>Lactobacillus sporogenes</i> mais contenant <i>Bacillus coagulans</i>
Medilac-Vita	Hanmi Pharmaceutical Co. Ltd., Beijing, China	<i>Bacillus subtilis</i> RO179
Nature's First Food	Nature's First Law, San Diego, USA	Produit contenant 42 espèces probiotiques dont <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus polymyxa</i> , <i>Bacillus pumilus</i> et <i>Bacillus laterosporus</i>
Neolactoflorene	Newpharma S.r.l., Milan, Italie	Commercialisé en tant que <i>Bacillus subtilis</i> mais contenant <i>Bacillus coagulans</i>
Primal Defense™	Garden of Life®, Palm Beach, USA.	<i>Bacillus subtilis</i>
Probis®	Safisis, Lesaffre, France	<i>Bacillus subtilis</i> CUI

Remarque: les produits du marché Vietnamien n'apparaissent pas dans ce tableau.

Tableau 2: Principaux produits commerciaux contenant une ou plusieurs souches de *Bacillus* probiotique (d'après Cutting 2011)

4.1. *Bacillus subtilis*

B. subtilis est un bacille à Gram positif, ubiquitaire, mésophile, capable de former des endospores.

La génétique et la physiologie de cette espèce a été largement étudiée. Bon nombre de préparations probiotiques désignaient à l'origine leurs souches comme *B. subtilis*, mais des identifications ultérieures ont révélé qu'il s'agissait d'autres espèces de *Bacillus* (Tableau 2). *Bacillus subtilis* est utilisé depuis plusieurs années comme probiotique, notamment dans le produit commercialisé Biosporin® (souche 2335, Biofarm, Ukraine). On le retrouve en combinaison avec *Bacillus licheniformis* 2336, et il est préconisé pour limiter les infections aiguës ou chroniques chez l'Homme. Plusieurs études cliniques ont été réalisées sur *Bacillus subtilis* 2335, afin de démontrer ses effets probiotiques, mais aucune n'a été mise en place avec la rigueur d'un essai clinique complet (Cutting 2011).

Bacillus subtilis est capable de produire plusieurs substances antimicrobiennes, notamment l'amicoumacin. Pinchuk et coll. (2001) ont montré, *in vitro* chez *Bacillus subtilis* 3, une activité inhibitrice contre *Helicobacter pylori*, un pathogène responsable de nombreuses infections gastriques et intestinales.

La souche *B. subtilis* var. Natto est utilisée dans la préparation d'un aliment de base dans la culture japonaise, le Natto, qui consiste en la fermentation de graines de soja. Plusieurs effets bénéfiques ont été associés à la consommation de Natto, incluant la stimulation du système immunitaire et la prévention de caillots artériels (Cutting 2011). Kosaka et coll. (1998) ont montré que *Bacillus subtilis* stimule la production d'interféron *in vitro*. De plus, il pourrait également induire la production de cytokines pro-inflammatoire (IL-6) (Duc *et al.* 2004).

In vivo, l'administration de *Bacillus subtilis* RJGP16 chez le porcelet, entraîne une stimulation de l'expression des gènes codant l'IL-6, la bêta-défensines-2 porcine, et le TLR2, ainsi qu'une augmentation du nombre de cellules productrices d'IgA, révélant une stimulation de l'immunité mucoale (Deng *et al.* 2013).

4.2. *Bacillus clausii*

Bacillus clausii était anciennement classée *Bacillus subtilis*. C'est un bacille à Gram positif sporulant, mésophile et alcalophile, tolérant des pH entre 7 et 14. Il est utilisé dans la préparation pharmaceutique Enterogermina® (Sanofi-Synthelabo SpA, Milan, Italie) depuis plus de 50 ans, pour la

prévention et le traitement des diarrhées infectieuses (Ciffo 1984). Cette espèce possède le statut QPS¹ depuis 2007. Contrairement à la plupart des produits probiotiques fournis sous forme de comprimés ou de capsules, les spores de *Bacillus* de la préparation Enterogermina[®] sont en suspension dans 5 mL d'eau (2×10^9 UFC), ce qui est supposé favoriser leur distribution jusqu'à la muqueuse intestinale. Il contient un mélange de quatre souches de *Bacillus clausii* résistantes à différents antibiotiques (Figure 7) :

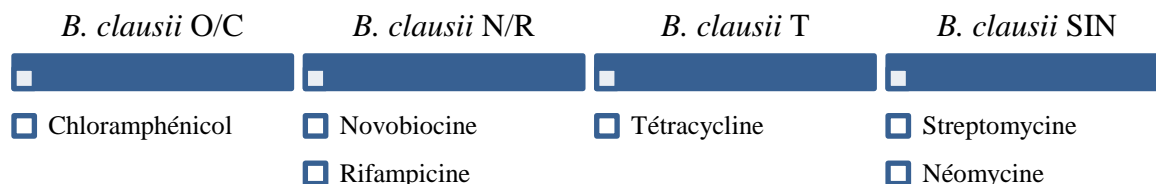


Figure 7: Antibiorésistance des souches de *Bacillus clausii* du produit Enterogermina[®].

Toutes ces souches sont dérivées de la souche *Bacillus clausii* ATCC 9799 qui est résistante à la pénicilline, à l'érythromycine, aux céphalosporines et à la cyclosérine, et initialement désignée comme *Bacillus subtilis* (Senesi et al. 2001). Il a été démontré que ces gènes de résistance sont stables et non-transférables (Bozdogan et al. 2004). Bien que les preuves concernant les effets bénéfiques du produit Enterogermina[®] soient peu nombreuses, plusieurs études ont suggéré que les spores présentes dans la préparation pouvait passer à nouveau sous forme végétative et séjourner dans le tractus intestinal (Mazza 1994). Urdaci et al. (2004) ont montré que les souches de *Bacillus clausii* présentes dans la préparation probiotique pouvaient sécréter une substance antimicrobienne, la clausine, active contre les bactéries à Gram positif comme *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium* ou *Clostridium difficile*. De plus, l'effet thérapeutique de la souche est étayé par sa capacité à stimuler la production d'IgA et à pouvoir moduler le système immunitaire (Novelli et al. 1984; Senesi et al. 2001; Urdaci et al. 2004).

Des études cliniques ont montré l'effet de la préparation Enterogermina[®] sur la modulation de la réponse immunitaire chez des enfants allergiques souffrant d'infections respiratoires chroniques. Ciprandi et coll. ont constaté qu'après administration de cette préparation probiotique, les symptômes respiratoires et le nombre d'éosinophiles chez les enfants allergiques étaient significativement réduits (Ciprandi et al. 2004; Ciprandi et al. 2005). De plus, Nista et coll. (2004) ont mis en évidence que la préparation probiotique permettrait de réduire les effets secondaires de l'antibiothérapie contre *Helicobacter pylori*, tels que les nausées, les diarrhées et les douleurs abdominales. Ces résultats ont été confirmés, après examen de la durée et du taux d'infections respiratoires chez 40 enfants (âge

¹ "Qualified Presumption of Safety" pour "Présomption d'innocuité reconnue"

moyen $4,3 \pm 1,5$ ans). En effet, après l'administration du produit Enterogermina[®] durant 3 mois, une diminution de la durée des infections des voies respiratoires est constatée pendant le temps du traitement, et ceci, jusqu'à 3 mois après la fin du traitement. Cependant aucun changement concernant la fréquence des infections n'est observé (Marseglia *et al.* 2007).

4.3. *Bacillus cereus*

Bacillus cereus est souvent considéré comme une bactérie pathogène pour les humains, étant donné que certaines souches sont responsables d'intoxications alimentaires. Cependant, toutes les souches de *Bacillus cereus* ne sont pas pathogènes. En effet, certaines d'entre elles ne possèdent pas les gènes permettant la synthèse d'entérotoxines et d'une toxine émétique¹, responsables de leur pathogénicité (Stenfors-Arnesen *et al.* 2008; Kamar *et al.* 2013). La préparation probiotique Paciflor[®] a été utilisée chez les animaux mais a été retirée du marché européen en 2001. A l'heure actuelle, les souches de *Bacillus cereus* utilisées en tant que probiotiques sont exclusivement disponibles sur le marché asiatique (Cutting 2011).

Les effets de *Bacillus cereus* en tant que probiotique n'ont pas été clairement mis en évidence à l'heure actuelle. La souche *Bacillus cereus* var. Toyoi, présente dans le produit Toyocerin[®] utilisée pour l'alimentation des porcelets, avait été décrite comme ayant des effets positifs sur le gain de poids, la stimulation du système immunitaire, la diminution des épisodes diarrhéiques et de la mortalité porcine (Scharek-Tedin *et al.* 2013). Bien qu'absente de la flore intestinale naturelle du porc, les spores de *Bacillus cereus* var. Toyoi pourraient repasser sous forme végétative une fois dans l'intestin, et potentiellement y exercer leurs effets bénéfiques. Ces derniers concerneraient une augmentation de la population de lymphocytes dans l'épithélium du jejunum, et donc de la réponse immunitaire systémique (Scharek *et al.* 2007; EFSA 2012). Cependant, une étude récente contredit cette hypothèse, mettant en évidence que la souche *Bacillus cereus* var. Toyoi ne présente aucun effet sur les fonctions de la barrière intestinale et les propriétés immunomodulatrices (Altmeyer *et al.* 2014).

De plus amples investigations sont, à l'heure actuelle, nécessaires pour démontrer les effets bénéfiques de cette espèce. L'optimisation de l'utilisation de souches probiotiques nécessite que les mécanismes à l'origine des effets bénéfiques soient connus.

¹ Toxine à l'origine de vomissements lors d'intoxications alimentaires

5. Effets des probiotiques sur la santé

Les effets bénéfiques des probiotiques sur la santé de l'hôte sont, en théorie nombreux, mais les preuves scientifiques confirmant ces allégations nécessitent des investigations supplémentaires. Les principaux effets avérés ont été établis à la suite d'études cliniques réalisées en double aveugle. D'autres sont seulement supposés, étant donné qu'ils reposent sur la base d'essais *in vitro* qui nécessitent des transpositions au niveau *in vivo* pour être validés.

La composition des communautés microbiennes indigènes du tractus intestinal est très complexe, et elle est spécifique de l'hôte et de son environnement. Il est actuellement difficile d'attribuer de manière spécifique un effet bénéfique à une espèce donnée de microorganisme. L'évaluation des effets d'une souche probiotique a permis à la communauté scientifique de mieux comprendre le rôle propre à certaines bactéries présentes dans l'intestin. Cependant, les effets synergiques de différentes souches associées et les mécanismes impliqués restent encore très mal connus.

Les principaux effets bénéfiques des probiotiques et les mécanismes associés sont présentés dans le Tableau 3 (résumé par Nagpal *et al.* 2012). Nous verrons, dans cette section, uniquement les effets de probiotiques administrés par voie orale, et dont le site d'action est le tractus gastro-intestinal. Il faut toutefois noter que les probiotiques peuvent être proposés pour le traitement de diverses pathologies comme les infections urogénitales par exemple. Les principaux effets bénéfiques des probiotiques sur la santé vont être développés de manière plus exhaustive dans la suite du manuscrit.

Effets sur la santé	Mécanismes supposés
Protection contre les pathogènes entériques	<ul style="list-style-type: none">• Activité antagoniste (compétition pour les nutriments et les récepteurs, production de composés antimicrobiens)• Stimulation du système immunitaire systémique• Effet adjuvant augmentant la production d'anticorps• Résistance à la colonisation et diminution de l'accès aux pathogènes (modification du pH, production de bactériocines/défensines, de peptides anti-microbiens et de métabolites toxiques)
Aide à la digestion du lactose	<ul style="list-style-type: none">• Les lactases bactériennes permettent le clivage du lactose en glucose et galactose assimilables
Prolifération bactérienne dans l'intestin	<ul style="list-style-type: none">• Les <i>Lactobacilli</i> influencent l'activité proliférative en diminuant la production de métabolites toxiques
Effet anti-cancéreux	<ul style="list-style-type: none">• Activité antimutagène,• Détoxification de métabolites carcinogènes• Altération de l'activité enzymatique pro-cancéreuse de microorganismes du côlon• Stimulation des fonctions immunitaires• Influence sur la concentration en sels biliaires• Neutralisation de carcinogènes alimentaires
Augmentation de la détoxification / excrétion de métabolites microbiens toxiques	<ul style="list-style-type: none">• Augmentation du nombre de bifidobactéries et changement métabolique d'une communauté bactérienne utilisant les glucides au détriment des protéines, limitant la production de métabolites toxiques et putréfactifs• Diminution des symptômes de l'encéphalopathie hépatique après l'administration de Bifidobactéries et de lactulose
Lutte contre l'hypercholestérolémie	<ul style="list-style-type: none">• Assimilation du cholestérol par les enzymes bactériennes• Diminution de l'activité des hydrolases de sels biliaires• Effet antioxydant
Lutte contre l'hypertension	<ul style="list-style-type: none">• L'action de peptidases bactériennes sur les protéines du lait engendre des tripeptides anti-hypertensifs• Des composants de l'enveloppe bactérienne agissent comme inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine
Lutte contre les infections à <i>Helicobacter pylori</i>	<ul style="list-style-type: none">• Inhibition compétitive pour les sites de colonisation
Encéphalopathie hépatique	<ul style="list-style-type: none">• Inhibition compétitive de la flore productrice d'urée
Amélioration des rendements nutritionnels	<ul style="list-style-type: none">• Production de vitamines et absorption de minéraux

(Suite)	
Modulation du système immunitaire	<ul style="list-style-type: none">• Renforcement de l'immunité spécifique et non-spécifique contre les infections et tumeurs par l'immunomodulation des tissus lymphoïdes associés au tractus• Effet adjuvant dans les réponses immunitaire spécifiques à un antigène• Modulation de l'activité des macrophages et lymphocytes• Stimulation de la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires• Augmentation de la production d'anticorps
Lutte contre les allergies	<ul style="list-style-type: none">• Prévention de la translocation des antigènes dans la circulation sanguine• Prévention des réponses immunologiques excessives dues à l'augmentation de la stimulation antigénique de l'intestin
Lutte contre les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)	<ul style="list-style-type: none">• Réduction de la production de cytokines pro-inflammatoires lors de maladies de Crohn• Maintien de la rémission des symptômes lors de colites ulcéreuses et de pouchites• Réduction des symptômes lors d'un syndrome de l'intestin irritable

Tableau 3: Principaux effets bénéfiques associés à la prise de probiotiques et mécanismes supposés d'après Nagpal et coll. (2012)

5.1. Prévention des infections intestinales

A l'origine, les probiotiques ont été utilisés pour traiter les infections intestinales. Plusieurs études ont montré les effets préventifs et thérapeutiques des probiotiques dans un grand nombre d'infections (Pyar *et al.* 2013). Plusieurs souches probiotiques possèdent la capacité d'inhiber la colonisation intestinale par des pathogènes.

5.2. Traitement des diarrhées

Dans le monde, 4 milliards d'épisodes diarrhéiques surviennent chaque année, induisant 4% de décès. La prévention de la diarrhée est un enjeu majeur de santé publique. Le traitement conventionnel de la diarrhée est basé principalement sur l'administration orale de solutions de réhydratation orale afin de remplacer les liquides physiologiques perdus pendant l'épisode diarrhéique, et éviter ainsi la déshydratation corporelle (Samadi *et al.* 1983). L'effet de probiotiques sur les diarrhées a été largement étudié, et leur efficacité dans la prévention et le traitement des diarrhées de différentes étiologies a été démontré, principalement lors de la mise en œuvre des souches *Lactobacillus rhamnosus* GG et *Saccharomyces boulardii* (Jones 2010).

5.2.1. Diarrhées associées à la prise d'antibiotiques

La diarrhée peut être une complication faisant suite à un traitement antibiotique (chez 39% des patients hospitalisés environ), en particulier pour les antibiotiques à large spectre comme la clindamycine, les bêta-lactamines et les céphalosporines de 3^{ème} génération. *Clostridium difficile*, un agent pathogène capable de croître rapidement et produisant des toxines causant des dommages au niveau du côlon, est responsable d'environ 10 à 20% des diarrhées associées aux antibiotiques. Ces diarrhées sont liées à une altération générale de la microflore intestinale, conduisant à une modification du métabolisme des glucides par les bactéries coliques, une diminution de l'absorption des acides-gras à chaîne courte et donc à une modification de l'osmolarité intestinale (Surawicz 2003). L'administration de probiotiques avant et/ou pendant le traitement antibiotique a montré, dans la plupart des études menées, une réduction de la fréquence et/ou de la durée des épisodes de diarrhée, ainsi qu'une diminution de la gravité de leurs symptômes (Kotowska *et al.* 2005). Une étude menée par Johnston et coll. (2007) sur 3432 individus, mettant en œuvre des souches de *Bacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Lactobacilli* spp., *Lactococcus* spp., *Leuconostoc cremoris*, *Saccharomyces* spp., ou *Streptococcus* spp. seules ou combinées, suggère un effet préventif des probiotiques vis-à-vis de diarrhées associées aux antibiotiques. Cependant, les conclusions d'autres études restent limitées concernant l'utilisation de probiotiques pour ces mêmes désordres intestinaux (Szajewska *et al.* 2014).

5.2.2. Diarrhée à *Rotavirus* aiguë

Les gastro-entérites aiguës peuvent avoir une origine bactérienne ou virale. Le *Rotavirus* est l'une des causes les plus courantes de la diarrhée aiguë chez l'enfant. Elle contribue à une mortalité importante dans le monde entier, en particulier dans les pays en voie de développement (Claeson et Merson 1990). Le *Rotavirus* infecte et se réplique dans les cellules épithéliales de l'intestin grêle, conduisant à une rupture partielle de la muqueuse intestinale avec une augmentation de sa perméabilité (Salim *et al.* 1990). Récemment, les probiotiques ont été proposés comme traitement d'appoint pour le traitement de la diarrhée aiguë, principalement pour réduire la durée des épisodes diarrhéiques. Les études menées montrent concrètement l'efficacité de deux souches de probiotiques, *Lactobacillus rhamnosus* GG et *Saccharomyces boulardii*. Leurs effets sur la durée de la diarrhée sont bien établis, et l'efficacité de la souche LGG comme traitement d'appoint est considérée comme la plus concluante (Szajewska *et al.* 2007; Basu *et al.* 2009; Grandy *et al.* 2010).

5.3. Probiotiques et Immunomodulation

Une des fonctions principales de la flore intestinale est le développement du système immunitaire et le maintien de son homéostasie. Un des nombreux effets attribués à la consommation de probiotiques, notamment dans le cas de *Bacillus*, concerne la stimulation et la modulation du système immunitaire intestinal. La recherche concernant les effets des probiotiques sur le système immunitaire et leurs mécanismes d'action est longtemps restée limitée du fait de l'absence d'études expérimentales solides ou d'essais cliniques en double aveugle contre un placebo. Aujourd'hui, des essais cliniques et des études expérimentales mieux ciblés ont permis d'objectiver les effets bénéfiques de certains probiotiques et de mieux comprendre les interactions moléculaires entre les composants bactériens et les cellules de l'hôte (cellules épithéliales intestinales et cellules du système immunitaire), à l'origine des effets observés. La colonisation du tractus intestinal par des probiotiques des genres *Lactobacillus* ou *Bifidobacterium* conduit à l'immunomodulation du système immunitaire via les tissus lymphoïdes associés (Delcenserie *et al.* 2008). La liaison des MAMPs aux récepteurs cellulaires va conduire à l'activation des cellules présentatrices d'antigènes et à la production de nombreuses cytokines pro- et anti-inflammatoires (Clarke et Mullin 2008). Cette reconnaissance des MAMPs par les récepteurs cellulaires constitue le point de départ de la modulation des réponses immunitaires innée et adaptative (Galdeano et Perdigon 2006). Différentes études *in vitro* ont montré que la réponse immunitaire est à la fois spécifique de l'espèce et de la souche probiotiques (Meijerink et Wells 2010).

Les effets immunomodulateurs des probiotiques dépendent de l'état immunologique de l'hôte. En effet, il faut distinguer deux types distincts d'effets sur l'immunité, selon que l'on s'adresse à un individu sain ou à des patients atteints d'une inflammation de l'intestin comme dans le cas d'une maladie inflammatoire chronique. Chez un individu sain, les probiotiques vont avoir un effet immunostimulant, permettant une plus grande efficacité du système immunitaire lors d'une rencontre avec un pathogène. En revanche, chez les individus atteints de pathologies digestives inflammatoires, certains probiotiques atténuent l'inflammation, diminuent les symptômes et/ou retardent les rechutes, principalement lorsqu'ils sont associés à des traitements médicamenteux (Heyman et Heuvelin 2006).

5.3.1. Effets des probiotiques chez l'Homme sain

Les effets des probiotiques chez l'Homme sain passent par la stimulation de l'immunité innée, une des premières lignes de défense lors d'une infection. Le système immunitaire inné utilise des mécanismes visant à éliminer les microorganismes pathogènes de façon non-spécifique et rapide. *In*

vitro, plusieurs études ont montré que les cellules mononucléées périphériques humaines (PBMC)¹, en présence des souches de *Lactobacillus*, de *Streptococcus* ou de *Bifidobacterium*, sécrètent des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF α et IFN γ) (Solis Pereyra et Lemonnier 1993). Cette sécrétion est plus importante en présence de bactéries vivantes que de bactéries mortes (Miettinen *et al.* 1996), et l'intensité de la réponse est dépendante de la souche et de la dose. Ces observations résultent d'une mise en présence directe de la bactérie avec les cellules immunitaires. Elles sont peu représentatives de la configuration *in vivo* décrite précédemment, où les probiotiques sont séparés du système immunitaire par la barrière intestinale.

Dans la littérature, de nombreux essais cliniques ont été publiés, mais ils doivent être considérés avec prudence. Seules les études cliniques en double aveugle contre un placebo peuvent être considérées comme preuves objectives des effets des probiotiques sur l'individu sain. Les données prises en compte généralement concernent la prolifération des lymphocytes et la production de cytokines (IL-1, IL-2, IL-6, TNF α , ...) par les cellules du système immunitaire, généralement les macrophages (Nagpal *et al.* 2012). Dans une étude réalisée sur 52 volontaires sains recevant une préparation de *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (5×10^{10} UFC/jour), l'activité phagocytaire des macrophages augmente de 15 %, et l'activité cytotoxique des cellules NK de plus de 70 %. Ce potentiel effet bénéfique s'éteignant après arrêt du traitement (Sheih *et al.* 2001). Des résultats similaires ont été obtenus chez 30 volontaires sains consommant du lait écrémé enrichi en *Bifidobacterium lactis* HN019, comparativement aux individus consommant le lait écrémé non-enrichi en *Bifidobacterium lactis* (Chiang *et al.* 2000). La plupart des études suggèrent que les probiotiques renforcent l'immunité innée, mais très peu d'études ont analysé l'impact d'une supplémentation probiotique sur l'apparition d'épisodes infectieux.

L'immunité innée n'est pas la seule à pouvoir être stimulée par les probiotiques. L'immunité acquise (ou adaptative) est spécifique d'un antigène, elle est néanmoins plus lente à mettre en place en comparaison à l'immunité innée. Elle est déclenchée suite à la rencontre des macrophages ou des cellules dendritiques avec un antigène, conduisant à l'activation des lymphocytes T. En cas d'infection bactérienne ou virale par voie orale, une réponse immunitaire adaptative locale est mise en place pour assurer la protection des muqueuses, en induisant la production d'IgA. Dans l'ensemble, les résultats cliniques indiquent un renforcement par certains probiotiques (*Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus johnsonii* et/ou certaines bifidobactéries) de l'immunité sécrétoire IgA au niveau de la muqueuse intestinale vis-à-vis de pathogènes viraux ou bactériens. Le nombre d'études reste cependant restreint, et la corrélation existante entre les taux plus élevés d'IgA sécrétoires et la prévention des infections reste à démontrer (Heyman et Heuvelin 2006).

¹ Pour « Peripheral Blood Mononuclear Cells »

Etant donné les effets observés chez l'Homme sain, il est logique d'envisager des propriétés immunomodulatrices par les probiotiques chez l'Homme atteint de syndromes pathologiques, plus précisément dans le cas de dérégulation immune comme observé lors de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ou d'allergies.

5.3.2. Effets des probiotiques dans les phénomènes allergiques

Dans les pays développés, le style de vie moderne et aseptisé pourrait être à l'origine de l'augmentation des cas allergiques. En effet, le système immunitaire est moins sollicité par les germes exogènes stimulant le système immunitaire, ce qui peut conduire à une dérégulation des réponses lymphocytaires régulatrices vis-à-vis des antigènes environnementaux. Cette théorie, appelée « théorie de l'hygiène », se traduirait par une réponse inappropriée du système immunitaire contre des antigènes, alimentaires par exemple, qui ne sont alors plus tolérés.

La régulation de la balance Th1/Th2, impliquée dans les phénomènes allergiques, pourrait être modulée par les probiotiques. En effet, lorsque les microorganismes probiotiques interagissent avec les cellules de la muqueuse intestinale, comme les cellules dendritiques, la production de cytokines va activer les lymphocytes T. Cette activation peut entraîner l'induction de lymphocytes Treg, conduisant à un état d'hyperréactivité des lymphocytes Th2, dont l'hyperréactivité est responsable des allergies.

L'induction de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-12, l'IFN γ , l'IL-6, le TNF α et l'IL-1, les probiotiques peuvent promouvoir la polarisation de la réponse vers un profil de cellules Th1, qui exercera alors un effet suppressif sur les réponses Th2, et permettra de limiter les désordres allergiques (Cross et Gill 2001; Grangette 2007).

5.3.3. Effets des probiotiques sur les pathologies inflammatoires

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) incluent un spectre de pathologies caractérisées par une inflammation, des ulcères, et un rétrécissement du tractus gastro-intestinal entraînant des douleurs abdominales, des diarrhées et des saignements gastro-intestinaux. Des souches probiotiques différentes ont été utilisées pour traiter la maladie de Crohn. La souche probiotique *Saccharomyces boulardii* a récemment été utilisée pour prévenir les rechutes (Bourreille *et al.* 2013). Cependant, aucun effet bénéfique pour les patients atteints de la maladie de Crohn n'a été observé.

Les colites ulcéreuses provoquent une inflammation de la muqueuse du rectum, qui reste confinée au niveau du côlon. Plusieurs études ont démontré l'importance de la flore intestinale dans la

pathogénèse de la maladie. Une modification de la flore bactérienne par les probiotiques pourrait atténuer le processus inflammatoire et éviter les rechutes. Différents essais cliniques ont montré l'efficacité des probiotiques pour le traitement ou le maintien de la rémission lors de colites ulcéreuses notamment avec l'utilisation des souches *Escherichia coli* Nissle (Kruis *et al.* 2004; Matthes *et al.* 2010) et *Lactobacillus rhamnosus* GG (Zocco *et al.* 2006).

L'immunomodulation par les probiotiques compte parmi les effets bénéfiques les plus prometteurs qui leur sont associés. D'autres effets sur la santé leur sont aujourd'hui attribués, ils vont être décrits dans la suite du manuscrit.

5.4. Prévention du cancer et effets anti-tumoraux

Les mécanismes proposés pour expliquer les effets anticancéreux des probiotiques, reposeraient sur leur capacité à inhiber des enzymes produites par le microbiote intestinal, capables de convertir des composés de l'alimentation en molécules procarcinogènes (Kumar *et al.* 2010; Kumar *et al.* 2012). Chez la souris, la concentration de ces enzymes bactériennes pourrait être réduite par l'administration de *Lactobacillus rhamnosus* GG (Drisko *et al.* 2003).

Une étude a rapporté une induction de la mort cellulaire par apoptose de cellules de carcinome de côlon (Caco-2) lorsqu'elles sont incubées en présence des souches probiotiques *Lactobacillus rhamnosus* GG et *Bifidobacterium lactis* (Altonsy *et al.* 2010). Cependant, ces travaux ne font pas état des effets de tels probiotiques sur des cellules saines de côlon. Par un mécanisme similaire, *Propionibacterium freundenrichii* semble induire la mort cellulaire de différentes lignées de carcinome de côlon et de cancers gastriques, par la sécrétion d'acides gras à chaînes courtes (Jan *et al.* 2002).

6. Mécanismes d'action des probiotiques

Nous avons vu que les bactéries probiotiques pouvaient avoir de multiples et divers effets sur l'organisme de l'hôte. Différents microorganismes peuvent influencer l'environnement luminal intestinal, les fonctions de barrière de l'épithélium et de la muqueuse, ainsi que le système immunitaire associé. Les probiotiques peuvent exercer leurs effets sur différents types cellulaires impliqués dans les réponses immunitaires innée et adaptative, comme les cellules épithéliales, les cellules dendritiques, les monocytes/macrophages, les lymphocytes B, les lymphocytes T (incluant les

cellules T régulatrices), et les cellules NK. Le Tableau 4 présente de manière simplifiée les principaux mécanismes d'action des probiotiques. Ces mécanismes sont illustrés sous forme de schéma Figure 8.

Mécanismes d'action des probiotiques

Activité antimicrobienne

- Diminution du pH luminal par la production de métabolites acides
- Sécrétion de peptides antimicrobiens
- Inhibition de l'invasion bactérienne par compétition pour les nutriments
- Inhibition de l'adhésion bactérienne aux cellules épithéliales par compétition pour les récepteurs

Augmentation des fonctions de barrières

- Stimulation de la production de mucus
- Augmentation de l'intégrité de la barrière intestinale (jonctions serrées)

Immunomodulation

- Effets sur les cellules épithéliales intestinales
 - Effets sur les cellules dendritiques
 - Effets sur les monocytes/macrophages
 - Effets sur les lymphocytes
 - Lymphocytes B
 - Lymphocytes T
 - Cellules NK
-

Tableau 4: Principaux mécanismes d'action des probiotiques d'après Ng *et al.* (2009).

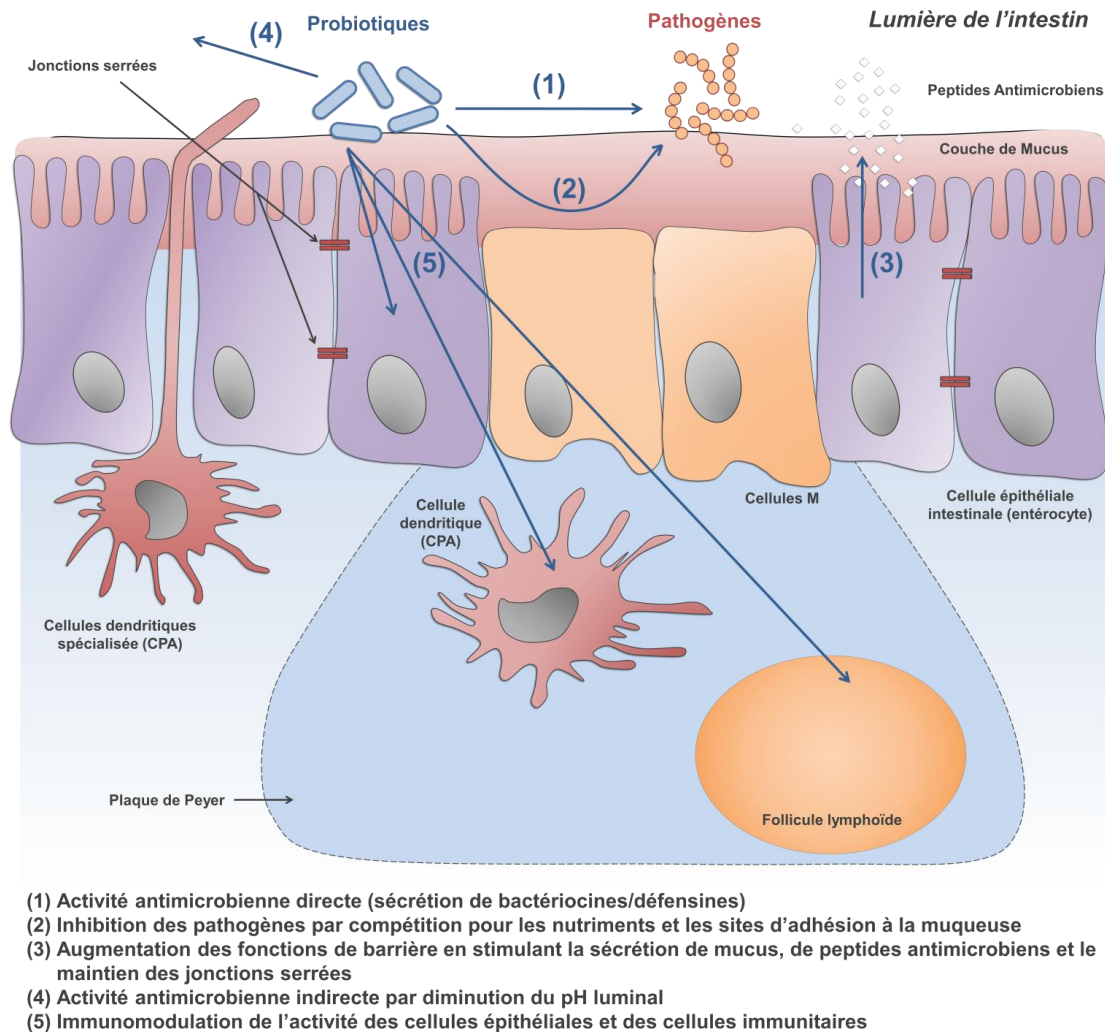


Figure 8: Représentation schématique des principaux mécanismes d'action des probiotiques (adapté de Ng *et al.* 2009).

Les mécanismes d'action présentés ici sont décrits de manière plus exhaustive dans la suite du manuscrit.

6.1. Modification du microbiote intestinal

Les bactéries probiotiques peuvent jouer un rôle antagoniste vis-à-vis des bactéries pathogènes (Figure 8), en réduisant le pH luminal, en inhibant l'adhésion des bactéries aux cellules intestinales, ou en produisant des composés antimicrobiens (Corr *et al.* 2009). Un des mécanismes par lequel la flore intestinale résiste à la colonisation par des bactéries pathogènes résulte de la mise en place d'un milieu physiologiquement restrictif (pH, potentiel redox et production de sulfure d'hydrogène). De plus, la

production, par les bactéries probiotiques, de composés antimicrobiens appelés bactériocines, est également susceptible de contribuer à leur activité bénéfique. Les défensines, des peptides antimicrobiens produits par les cellules intestinales, sont impliquées dans les mécanismes de défense de l'immunité innée. Les probiotiques peuvent stimuler leur sécrétion, contribuant à l'augmentation de l'effet barrière de la muqueuse contre les pathogènes. L'induction de la production des défensines, dépendante de l'activation de la voie de signalisation NF- κ B, est consécutive à la reconnaissance d'antigènes bactériens (Schlee *et al.* 2007).

6.2. Augmentation de l'effet barrière

En plus de leurs effets sur l'inhibition de la croissance d'organismes pathogènes potentiels, les probiotiques peuvent agir au niveau des interactions cellulaires et de la « stabilité » cellulaire par en augmentant la fonction de barrière au travers de la modulation de la phosphorylation des protéines du cytosquelette et des jonctions serrées (Figure 8). La fonction de la barrière intestinale est maintenue par plusieurs systèmes interdépendants, comprenant la sécrétion de mucus, de chlorure et d'eau, ainsi que la liaison des cellules épithéliales par les protéines des jonctions serrées. Toutefois, la barrière intestinale peut être facilement perturbée, notamment dans des cas de MICI, d'infections entériques et certaines maladies auto-immunes. Ceci justifie l'intérêt de trouver de nouveaux moyens pour maintenir ces fonctions actives (Meddings 2008).

Les mécanismes par lesquels les bactéries probiotiques peuvent améliorer la fonction de barrière de la muqueuse intestinale ne sont pas clairs. Ils pourraient être liés à des modifications de la sécrétion de mucus ou de chlorure, ou à des changements dans l'expression des protéines des jonctions serrées. Certaines bactéries probiotiques modifient l'expression des gènes MUC impliqués dans la sécrétion de mucus, limitent la sécrétion de chlorure et d'eau (Ng *et al.* 2009). Les protéines des jonctions serrées sont des structures dynamiques, soumises à des changements structurels qui dictent leur état fonctionnel. Les bactéries probiotiques pourraient modifier la signalisation de la protéine kinase C et la redistribution de la protéine zonula occludens-2 (ZO-2), un facteur crucial dans le maintien des jonctions serrées épithéliales (Zyrek *et al.* 2007).

6.3. Effets immunomodulateurs

La muqueuse du tractus intestinal renferme environ 70% des cellules du système immunitaire de l'Homme. Cela fait de l'intestin un site clef pour la régulation de la réponse immunitaire par les

probiotiques. Nous allons aborder dans cette section les différents sites d'action des probiotiques présents dans le tractus gastro-intestinal.

6.3.1. Effets sur les cellules épithéliales intestinales

Les cellules épithéliales distinguent les bactéries commensales/probiotiques des bactéries pathogènes de plusieurs façons. Cette observation a été faite par Lammers *et al.* (2002) et Otte et Podolsky (2004). Les auteurs ont montré que les bactéries probiotiques présentes dans le produit probiotique VSL # 3 n'induisaient pas la sécrétion de cytokine pro-inflammatoire (IL-8) par les cellules épithéliales comparativement aux agents pathogènes intestinaux (*E. coli* entéropathogène, *Salmonella dublin*, *Shigella dysenteriae*, et *Listeria monocytogenes*). L'induction de ces signaux cellulaires sur les cellules épithéliales passe par une reconnaissance des MAMPs par des récepteurs de type Toll-like (TLR), tels que les TLR-2 et de TLR-4 (Figure 9 A). Les bactéries pathogènes induisent des réponses pro-inflammatoires sur les cellules épithéliales de l'intestin par l'activation du facteur de transcription NF- κ B. En revanche, les espèces non pathogènes peuvent atténuer les réponses pro-inflammatoires en inhibant la dégradation du répresseur de la voie NF- κ B, I κ B (Madsen 2006). Ces interactions avec les probiotiques conduisent à la production de cytokines qui améliorent également la régénération des cellules épithéliales et inhibent l'apoptose (Rakoff-Nahoum *et al.* 2004).

6.3.2. Effets sur les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DC) et les macrophages sont des cellules présentatrices d'antigènes qui sont impliquées dans la reconnaissance bactérienne précoce et qui vont « façonner » les réponses des lymphocytes T. Dans l'intestin, les DC et les macrophages ont des fonctions spécialisées, contribuant à l'induction d'une tolérance orale par la génération de lymphocytes T régulateurs et de lymphocytes B. Ces derniers produisent des IgA consécutivement à la sécrétion de cytokines comme l'IL-10 et le TGF- β (Figure 9). Les cellules dendritiques intestinales interagissent directement avec les bactéries probiotiques présentes dans la lumière intestinale, en passant leur dendrites entre les jonctions serrées épithéliales (Figure 9, B), et indirectement avec des bactéries ayant traversé l'épithélium via les cellules M (Figure 9, C) (Stagg *et al.* 2003). Après capture de l'antigène, les cellules dendritiques pourront activer les lymphocytes T natifs, par présentation de l'antigène bactérien (Figure 9 D). Ces cellules présentatrices d'antigènes semblent être au centre de la médiation immunologique des effets bénéfiques des probiotiques. Cela souligne l'importance de comprendre les effets fonctionnels de différentes bactéries, aussi bien probiotiques que pathogènes sur ces cellules. L'immunomodulation par les probiotiques peut être orientée vers un effet pro-inflammatoire ou anti-

inflammatoire, selon l'état immunologique initial de l'hôte. Ce sont les cellules dendritiques qui vont orienter la différenciation vers une réponse inflammatoire par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Dans le cas de la mise en place d'une réponse anti-inflammatoire, les cellules dendritiques vont sécréter des cytokines anti-inflammatoires (IL-10 et TGF- β) conduisant à la différenciation des lymphocytes T activés en lymphocytes T régulateurs (Figure 9 F), capables d'inhiber la réponse inflammatoire (Hemarajata et Versalovic 2012).

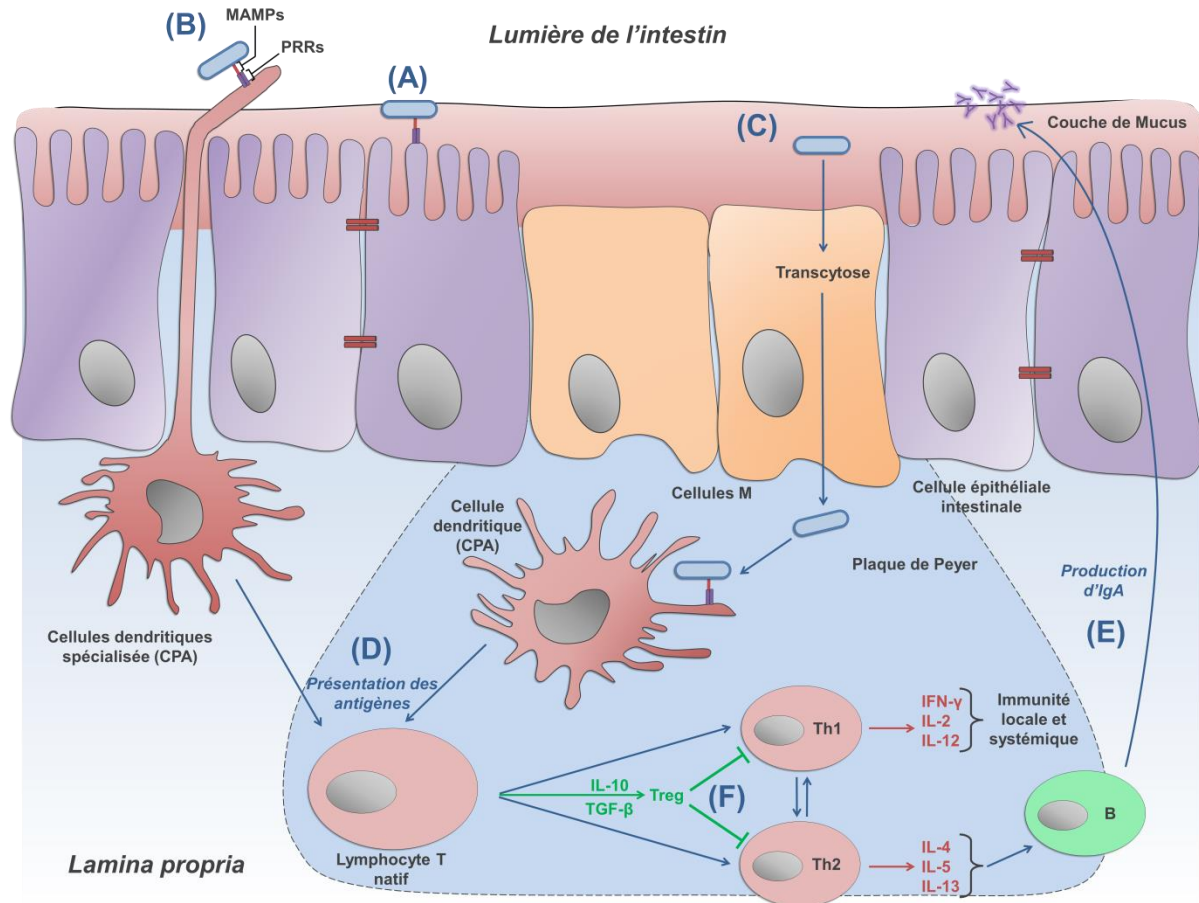


Figure 9: Représentation schématique des mécanismes d'immunomodulation induits par les probiotiques au niveau de la muqueuse intestinale. L'interaction directe avec les cellules épithéliales intestinales entraîne une modulation de leur activité pouvant conduire à la production de cytokines (A). L'interaction directe des bactéries avec les DC (B), ou leur translocation vers la lamina propria (C), peut conduire à la production de cytokines par les DC et macrophages, et conduire à l'activation des immunités innée et adaptative. Une fois les cellules M traversées, et l'absorption par les CPAs, la présentation des antigènes aux lymphocytes T natifs va conduire à leur activation (D). Consécutivement à cette interaction, une cascade de signalisation peut entraîner une réponse immunitaire des muqueuses, avec entre autre la sécrétion d'IgA dans l'intestin (E). Ce sont les mêmes processus qui vont orienter les composants du système immunitaire vers un motif tolérogène non-inflammatoire, par l'induction de cellules T régulatrices (F).

La souche *Lactobacillus reuteri* 100-23 induit la production d'IL-10 par des cellules dendritiques, ce qui favorise la production de TGF- β (Livingston *et al.* 2010).

6.3.3. Effets sur les lymphocytes B

Les bactéries probiotiques peuvent exercer des effets bénéfiques et moduler la réponse immunitaire face à des antigènes potentiellement nocifs, au travers de leurs effets sur les lymphocytes B et sur la production d'anticorps (Figure 9 E). La souche *Lactobacillus rhamnosus* GG, administrée à des enfants souffrant de gastroentérite aiguë, stimule la réponse immunitaire humorale non-spécifique, se traduisant par une augmentation de la sécrétion d'anticorps (IgG, IgA, IgM) par les lymphocytes B (Kaila *et al.* 1992).

Les effets des bactéries probiotiques sur les lymphocytes B et sur la production d'anticorps ont également été évalués lors d'essais de vaccination (Maidens *et al.* 2013). Une augmentation des taux d'IgA spécifiques à *Salmonella* ont été observés chez des sujets qui ont reçu une combinaison de *L. rhamnosus* GG et une vaccination à *Salmonella* (Fang *et al.* 2000).

6.3.4. Effets sur les lymphocytes T

Le type de réponse des lymphocytes T est principalement contrôlé par les cellules dendritiques (Figure 9 D). Chez l'Homme, la préparation probiotique VSL#3 induit la production d'IL-10 par des lymphocytes T immatures, et la co-culture de cellules dendritiques avec les souches probiotiques conduit à une diminution du nombre de lymphocytes Th1 (Hart *et al.* 2004).

L'ingestion de *Lactobacillus rhamnosus* réduit la production d'IFN γ , d'IL-2 et d'IL-4 par les lymphocytes T périphériques chez les personnes saines. Il a été observé, chez un modèle murin avec dermatite, que les bactéries probiotiques pourraient également influencer la génération de cellules T régulatrices. L'administration orale quotidienne de lait fermenté contenant la souche *Lactobacillus casei* DN-114 001 réduit l'inflammation de la peau observée chez les animaux atteints. L'atténuation de l'hypersensibilité à l'alimentation, régulée par *Lactobacillus casei*, est due à une modulation de la réponse spécifique à l'antigène des lymphocytes T. Il a été proposé que *Lactobacillus casei* réduirait l'hypersensibilité par activation des lymphocytes Treg (Chapat *et al.* 2004).

7. Implication des entités moléculaires de la surface bactérienne dans l'interaction probiotique/hôte

La plupart des mécanismes décrits précédemment, à l'origine des effets bénéfiques potentiels des probiotiques nécessitent une interaction directe entre la bactérie et les cellules de l'hôte. Dans cette

section seront décrits les différents constituants moléculaires de la surface bactérienne, impliqués dans ces interactions, ainsi que leur rôle dans les effets associés à la consommation de probiotiques. Ces mécanismes restent à l'heure actuelle mal-connus, tandis que leur étude est nécessaire pour une meilleure compréhension du mode d'action des probiotiques afin de pouvoir optimiser au mieux l'utilisation de ces derniers.

7.1. Rappels sur la composition de la paroi des bactéries à Gram positif

La plupart des probiotiques actuellement étudiés sont des bactéries lactiques à Gram-positif, dont la paroi cellulaire (Figure 10) est typiquement composée d'une épaisse couche de peptidoglycane décorée par des protéines, des polysaccharides et des acides téichoïques (Delcour *et al.* 1999). Les principales macromolécules de la paroi cellulaire ont des structures de base similaires entre les espèces, mais diverses modifications, telles que la glycosylation, peuvent contribuer aux propriétés spécifiques de chaque souche de probiotique.

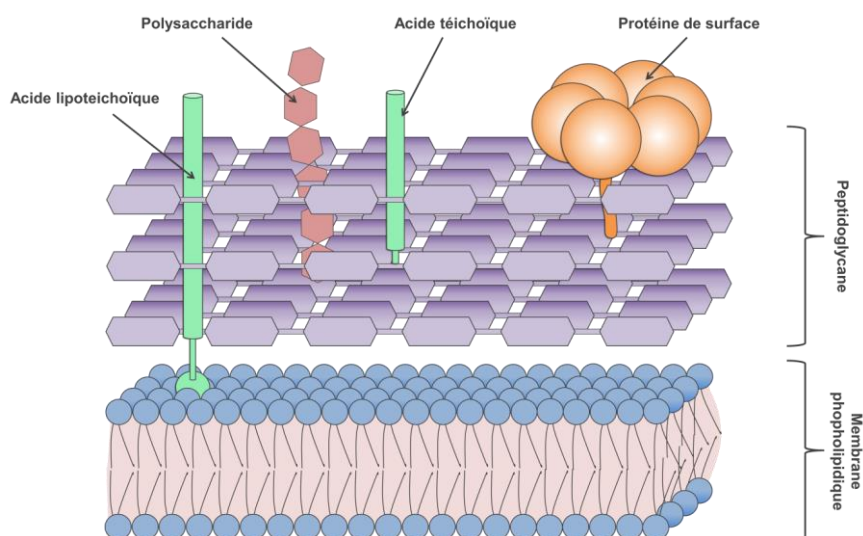


Figure 10: Composition et structure de la paroi des bactéries à Gram positif (modifié de Delcour *et al.* 1999).

La complexité de la compréhension des mécanismes d'action des probiotiques sont en partie liés à la présence de structures moléculaires similaires à celles retrouvées chez les bactéries pathogènes, celles-ci étant responsables de l'interaction avec les récepteurs de l'hôte. Actuellement, de nombreuses

études tentent d'élucider les mécanismes permettant à une cellule de l'hôte de différencier une bactérie pathogène d'une bactérie commensale/probiotique, compte tenu du fait que les structures de leurs parois respectives sont relativement similaires (Lebeer *et al.* 2010). Pour cela, il faut s'intéresser aux structures moléculaires des différents composants de la paroi bactérienne, et à leur possibilité d'interaction avec les récepteurs de l'hôte.

Les cellules de l'hôte, qui sont potentiellement les plus susceptibles d'interagir avec les probiotiques, sont les cellules épithéliales intestinales et les cellules dendritiques. Les récepteurs cellulaires (PRRs) ont une grande spécificité et vont pouvoir reconnaître une importante diversité de motifs moléculaires associés à la surface bactérienne (MAMPs), conduisant à une réponse rapide vis-à-vis des microorganismes rencontrés (Medzhitov 2007).

7.2. Interaction entre les récepteurs de l'hôte et les constituants de la paroi bactérienne

Les PRRs les plus étudiés appartiennent à la famille des récepteurs Toll-like (TLR). Ce sont des protéines transmembranaires présentes à la surface de la cellule ou sur la membrane des vésicules d'endocytose. La reconnaissance du ligand induit la dimérisation du TLR, et le recrutement de molécules adaptatrices au niveau intracellulaire, aboutissant à l'induction des voies de signalisation (Medzhitov 2007). Parmi les TLRs, on trouve le TLR2, qui se lie sous forme d'hétérodimère avec le TLR1 ou le TLR6, en fonction du ligand bactérien, ainsi que le TLR4 et le TLR5, qui peuvent tous être exprimés par les cellules épithéliales intestinales et les cellules dendritiques à des niveaux variables. Les récepteurs intracellulaires de type NOD (Nucleotide Oligomerization Domain Receptor) ainsi que les récepteurs extracellulaires Lectine de type C (Strober *et al.* 2005) sont connus pour transmettre des signaux après leur interaction avec les bactéries. En outre, les PRRs de surface ne fonctionnent pas de manière isolée, mais vont souvent coopérer avec les corécepteurs qui sont situés au niveau des radeaux lipidiques¹ de la membrane plasmique (Triantafilou *et al.* 2002). L'interaction entre un MAMP et un PRR conduit à l'induction de cascades de signalisation et d'une réponse moléculaire contre les microorganismes détectés. Cette réaction peut inclure la production de cytokines immunomodulatrices, de facteurs anti-microbiens ou cytoprotecteur. Les voies de signalisation induites impliquent généralement le facteur de transcription NF- κ B (Strober *et al.* 2005). La réponse cellulaire finale de ces interactions MAMP-PRR et les voies de signalisation induites dépendent du type de microorganisme et de la réactivité de la cellule hôte comme cela a été décrit

¹ Zones de la membrane plasmique de faible densité étant donnée la concentration élevée en cholestérol et sphingolipides dans ces zones, permettant le déplacement de ces microdomaines à la surface cellulaire

précédemment. L'objectif à long terme, avec les probiotiques, est d'adapter ces interactions pour induire un effet bénéfique désiré sur la santé.

7.2.1. Les constituants protéiques de la paroi bactérienne

- Le flagelle

Le premier contact entre les microorganismes intestinaux et les cellules intestinales est supposé se produire par le biais de l'interaction entre les plus grandes structures présentes à la surface microbiennes et les PRRs des cellules de l'hôte (Lebeer *et al.* 2010). Le flagelle est une structure permettant la mobilité de la bactérie, mais il n'est pas retrouvé chez toutes les souches. La flagelline est une protéine bactérienne dont l'implication dans la réponse pro-inflammatoire des cellules épithéliales intestinales a été observée dans le cas d'infection par des pathogènes (Zeng *et al.* 2003). La flagelline est reconnue par le TLR5, qu'elle provienne de bactéries à Gram négatif ou à Gram positif (Hayashi *et al.* 2001). Plus récemment, les flagelles ont été présentés comme acteurs de certains effets probiotiques. La flagelline du probiotique *E. coli* Nissle 1917 s'est avérée induire l'expression de la β -défensine 2, un peptide antimicrobien synthétisé par les cellules épithéliales intestinales pour contrer l'adhérence et l'invasion par des agents pathogènes (Schlee *et al.* 2007). Toutefois, les exemples concernant le rôle des flagelles dans les effets bénéfiques des probiotiques sont encore rares.

- Les fimbriae

Les *fimbriae* sont dédiés à l'adhésion bactérienne et à la formation de biofilm, ce qui les rend d'autant plus intéressant pour l'étude des effets probiotiques. Malheureusement, ils représentent les ligands des récepteurs intestinaux les moins documentés. Les *fimbriae*, parfois appelés pili, sont présents à la fois chez les bactéries à Gram positif et Gram négatif, mais leur biosynthèse et leur structure diffèrent sensiblement entre les deux groupes (Scott et Zähler 2006). Les *fimbriae* de souches commensales et pathogènes de *E. coli* sont connus pour se lier au TLR4 (Fischer *et al.* 2006). Certains lactobacilles probiotiques, tels que *Lactobacillus rhamnosus* GG, possèdent également des *fimbriae* impliqués dans l'adhésion au mucus, ce qui pourrait améliorer son interaction avec les récepteurs et l'induction des voies de signalisation associées (Lebeer *et al.* 2010). Toutefois, le rôle des *fimbriae* dans les effets probiotiques reste à valider.

- Les protéines 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 plasmique. 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.

On trouve parmi elles des protéines fortement associées à la paroi comprenant les protéines liées de manière covalente comme les lipoprotéines, et des protéines associées de manière non-covalente par des domaines N- ou C- terminaux transmembranaires par exemple (Vélez *et al.* 2007). On trouve également les protéines de la couche S qui forment une catégorie particulière de protéines associées à la paroi de manière non-covalente. Elles s'organisent à la surface des cellules bactériennes de façon à former une couche qui peut avoir une fonction de protection du microorganisme (Navarre et Schneewind 1999). Une autre sous-famille de protéines liées à la paroi bactérienne mais ne possédant ni peptide signal, ni motif d'ancrage, a été mise en évidence et nommée "anchorless proteins". Ce sont majoritairement des protéines intracellulaires impliquées dans les voies métaboliques des glucides ou des protéines (Chhatwal 2002).

Le rôle de ces protéines dans l'interaction probiotique/hôte a été largement rapporté (Sánchez *et al.* 2008). Elles pourraient participer au maintien de l'homéostasie intestinale par plusieurs mécanismes qui sont décrits dans le Tableau 5.

Adhésion bactérienne	- A la mucine, - Aux cellules épithéliales intestinales - Aux composants de la matrice extracellulaire.
Modulation de l'activité cellulaire	- Des cellules épithéliales intestinales, - Des cellules immunitaires.
Modification de l'expression de gènes cellulaires	- Impliqués dans le développement des jonctions serrées, - Impliqués dans l'apoptose des cellules

Tableau 5: Rôle des protéines de surface dans l'interaction avec l'hôte (d'après Sánchez *et al.* 2008).

La structure des protéines, comme leur degré de glycosylation par exemple, pourrait définitivement moduler les effets des souches probiotiques et avoir un rôle clé dans la réponse finale de l'hôte.

7.2.2. Les polysaccharides associés à la paroi

Le rôle des polysaccharides associés à la paroi (CPS) des bactéries probiotiques dans les interactions bactérie-hôte sont encore mal connus (Welman et Maddox 2003). Chez divers agents pathogènes, les CPS sont des facteurs de virulence clés, qui agissent en inhibant la phagocytose chez les macrophages et les neutrophiles. Les CPS de *L. casei* Shirota seraient des inhibiteurs de la réponse pro-inflammatoire par les macrophages (Yasuda *et al.* 2008) mais leur rôle exact et les mécanismes associés restent inconnus.

7.2.3. Le peptidoglycane

Le peptidoglycane (PG) est généralement « noyé » dans la paroi bactérienne, il est recouvert par plusieurs autres molécules de surface. Avant que le PG puisse être détecté par les PRR, des fragments de PG doivent être libérés par autolyse ou par l'action du lysozyme dans l'intestin. Le PG est un ligand du récepteur TLR2, avec CD14 pour co-récepteur (Lebeer *et al.* 2010). Des variations de la structure des fragments de PG peuvent être à l'origine d'activités biologiques différentes sur les cellules de l'intestin. En effet, certaines modifications des fonctions acides carboxyliques de la glutamine et de l'acide diaminopimélique, comme cela se produit chez *Lactobacillus plantarum*, limite la liaison avec le TLR. Ceci pourrait constituer une stratégie adoptée par certains microorganismes pour éviter l'induction de l'expression des cytokines pro-inflammatoires via le TLR2 (Asong *et al.* 2009). L'amidation de l'acide α -carboxylique isoglutamique diminuerait la détection par NOD1 et l'activation de la voie NF- κ B, ce qui représente une autre stratégie « d'évasion » de la bactérie face au système immunitaire (Wolfert *et al.* 2007). Certaines études ont suggéré que les interactions PG-NOD pourraient jouer un rôle dans des effets probiotiques, mais la fonction des différences de structure du PG dans ces interactions doit encore être démontrée.

7.2.4. Les acides téichoïques

Les acides téichoïques ont été découverts par l'équipe de James Baddiley (1958). Ils ont été décrits de manière plus exhaustive par Wicken et Knox (1975). Le terme « acide téichoïque » est

utilisé pour décrire deux polymères de la paroi des bactéries à Gram positif : les « wall teichoic acids » (WTA) et les acides lipotéichoïques (LTA). Ensemble, ils représentent 30% à 60% de la masse de la paroi. Les WTAs sont liés de manière covalente au peptidoglycane, tandis que les LTAs sont des polymères amphiphiles possédant une partie lipidique ancrée dans la membrane plasmique. Avec le peptidoglycane, les WTAs et les LTAs forment un réseau qui confère les fonctions de porosité, d'élasticité et de résistance de la paroi. Ils présentent chacun des structures très variables et leur abondance dépend de l'espèce et de la souche bactérienne, du stade ou du taux de croissance, du pH, de la source carbonée et de la disponibilité en phosphate du milieu (Neuhaus et Baddiley 2003). Dans la suite du manuscrit, nous allons nous intéresser plus spécifiquement aux LTAs.

- Structure des acides lipotéichoïques

La structure de base d'un LTA consiste en un polymère soluble qui est lié à la membrane plasmique par une ancre lipidique. Le polymère est formé d'unités répétées, généralement du glycérol ou du ribitol, et unies entre elles par des liaisons phosphodiester. Ce motif répété est substitué par différentes molécules, expliquant la diversité chimique entre différentes espèces bactériennes. Il convient de noter que les méthodes d'extraction des LTAs ont une incidence sur l'intégrité de cette famille moléculaire. Ces méthodes ont évolué depuis la découverte des LTAs, ce qui a conduit à une réévaluation de certains modèles structuraux, initialement établis à partir de LTAs en partie dégradées (Gisch *et al.* 2013). Afin de classer les différentes structures de LTAs décrites dans la littérature, celles-ci ont été subdivisées en cinq types. Les quatre types les plus couramment retrouvés dans la littérature sont représentés ci-dessous :

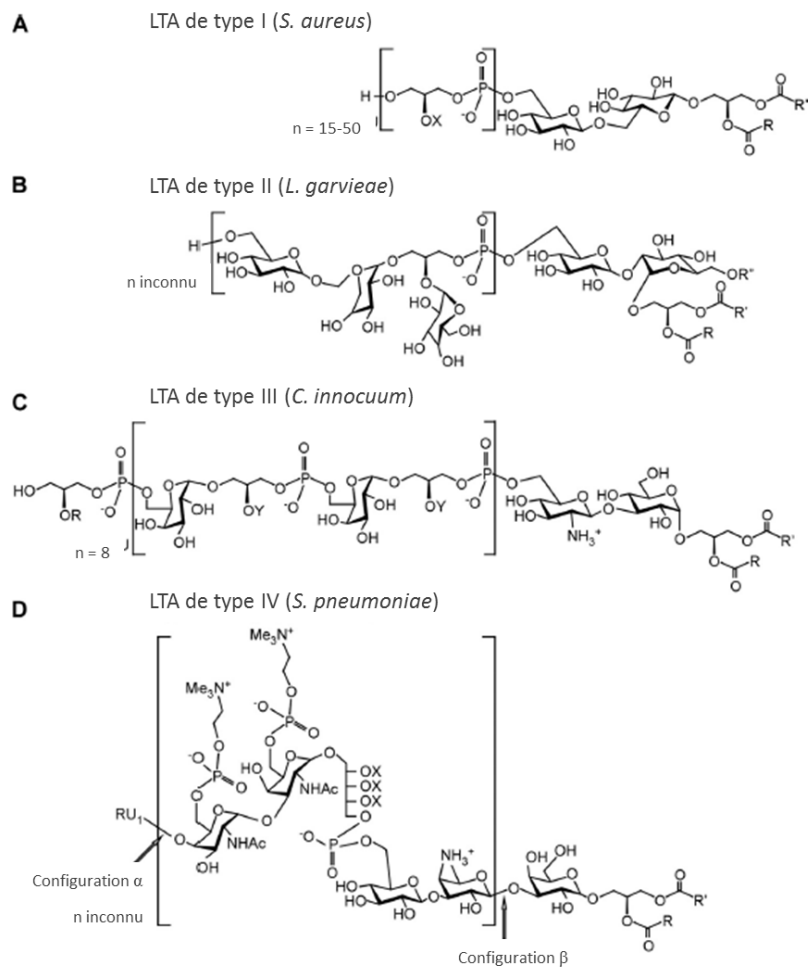


Figure 11: Principales structures d'acides lipotéichoïques (d'après Schneewind *et al.* 2014). (A) Structure des LTAs de type I de *Staphylococcus aureus*. Le nombre d'unités répétées (n) est indiqué près des crochets, les unités répétées de glycérol-phosphate sont substituées en position 2 du glycérol (X) par des protons hydrogènes, des esters de D-alanine ou de la *N*-acétylglucosamine. (B) Structure des LTAs de type II de *Lactobacillus garvieae*. (C) Structure des LTAs de type III de *Clostridium innocuum*. Les unités répétées de glycérol-phosphate sont substituées en position 2 du glycérol (Y) par des protons hydrogènes, de la glucosamine ou de la *N*-acétylglucosamine. (D) Structure des LTAs de type IV de *Streptococcus pneumoniae*. Les unités répétées de glycérol-phosphate peuvent être substituées avec des protons hydrogènes, des esters de D-alanine ou de la *N*-acétylglucosamine (X). Les substituants R, R' et R'' des glycolipides sont des chaînes alkyles.

Les LTAs de type I (Figure 11A) sont les plus représentés parmi toutes les structures décrites. Ils possèdent une structure simple constituée d'unités répétées de glycérol-phosphate (Gro-P), et pouvant être substituées en position 2 du glycérol par de la D-alanine (D-ala) ou des résidus glucosyl comme la *N*-acétylglucosamine (GlcNAc). Cette chaîne hydrophile est liée à un motif d'ancrage glycolipidique, donnant aux LTAs leur propriété de polymères amphiphiles. La diversité chimique des LTAs de type I dépend de :

- la longueur du polymère de Gro-P (de 10 à 60 unités),
- la nature chimique des substituants du glycérol des sous-unités Gro-P et du taux de substitution (jusqu'à 80% pour la D-alanine),
- la nature de l'ancrage glycolipidique dans la membrane (acides-gras en C13 en moyenne).

Les LTAs de type I que l'on trouve chez les *Firmicutes* (incluant *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus agalactiae*, et *Streptococcus pyogenes*) sont composés d'une chaîne hydrophile de poly(glycérol-phosphate). Chez *S. aureus* et *B. subtilis*, celle-ci est liée au carbone 6 de la fonction glycosyle non-réductrice d'un gentiobiosyldiacylglycérol (Morath *et al.* 2002). La chaîne de poly(glycérol-phosphate) est constituée de 15 à 50 unités. Les groupements hydroxyles en position 2 du glycérol de la chaîne hydrophile sont, à des degrés variables, substitués par des résidus D-alanyl ou glycosyl (Fischer 1988). Chez *S. aureus*, environ 70% et 15% des unités Gro-P sont respectivement substitués par des esters de D-alanine et de la *N*-acétylglucosamine (Morath *et al.* 2001). Chez des souches de *Streptococcus* du groupe B¹, la chaîne de poly(glycérol-phosphate) du LTA est substituée uniquement par de la D-alanine. Elle est rattachée à un kojibiose² qui la relie à la partie lipidique de la membrane (Schneewind et Missiakas 2014). Le dihexosyldiacylglycérol semble être l'ancre glycolipidique retrouvée la plus fréquemment dans la structure des LTAs de type I, bien qu'il existe des exceptions. A titre d'exemple, les LTAs de *Lactobacillus gasseri* JCM 1131 portent un tetrahexosylglycérol avec deux ou trois chaînes d'acides gras (Shiraishi *et al.* 2013). Certaines espèces, y compris chez les genres *Lactobacillus*, *Streptococcus*, et *Listeria*, peuvent produire deux variantes de LTA, où l'ancre glycolipidique peut être substituée par un groupe acyle ou phosphatidyle.

Les parties hydrophiles des LTAs de type II et III (Figure 11 B et C respectivement) sont composées d'unités répétées de glycosylalditol-phosphate. Par exemple, *Lactococcus garvieae* et *Clostridium innocuum* sont capables d'élaborer des LTAs de type II et III, dont les motifs répétés sont (Gal-Gal-Gro-P) et (Gal-Gro-P) respectivement. De plus, une troisième chaîne d'acide gras peut être présente dans la structure de l'ancre lipidique. Le glycérol de la chaîne hydrophile peut être substitué par du galactose, tandis qu'aucune D-alanylation n'a été observée (Schneewind et Missiakas 2014).

¹ Groupe de *Streptococcus* dont le réservoir principal est le tractus gastro-intestinal humain

² Glucose $\alpha(1\rightarrow2)$ glucose

Le type IV (Figure 11 D) concerne les LTAs de *Streptococcus pneumoniae*. Leur structure n'a été déterminée de manière précise que récemment. L'unité répétée est composée d'un pseudopentasaccharide 2-acétamido-4-amino-2,4,6-trideoxygalactose (AATGal), d'un glucose, et d'un ribitol-phosphate, suivi par deux résidus de *N*-acetylgalactosamine, substituées en position 6 avec de la phosphocoline (P-Cho). L'unité terminale peut être ou non substituée par la P-Cho, et les fonctions hydroxyles du ribitol-phosphate peuvent être substituées en quantités stœchiométriques par de la D-alanine. Le premier monomère est quant à lui lié à l'ose de l'ancre lipidique par une liaison en configuration β , tandis que les autres monomères sont liés en position α à l'unité précédente (Gisch *et al.* 2013).

Enfin, on trouve les LTAs de type V, un groupe qui comprend des structures macromoléculaires amphiphiles. Ils sont retrouvés notamment chez *Bifidobacterium bifidum* et *Micrococcus luteus*. Ce cinquième groupe a été défini par Fischer comme des composés polysaccharidiques liés à une partie lipidique (glycolipide ou phosphatidylinositol) et ne possédant pas d'unités répétées liées par des liaisons phosphodiester (Fischer 1987). Les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries à Gram négatif sont néanmoins exclus de cette classification.

- Les LTAs dans l'interaction probiotique-hôte

La présence dans la structure des LTAs de groupements phosphodiester anioniques et d'esters de D-alanine cationiques à pH physiologique, leur confère un caractère polyionique. Du fait de ce caractère polyionique, ainsi que de leur l'hydrophobicité, les LTAs peuvent indirectement influencer les propriétés d'adhésion des bactéries, en modifiant par exemple les propriétés physico-chimiques de la paroi bactérienne. L'hypothèse de l'intervention des LTAs 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 et Savage (1986). L'équipe fait état du rôle des LTAs dans l'adhésion de souches de *Lactobacillus* aux cellules épithéliales intestinales. Par la suite, dans un travail consacré à *Lactobacillus johnsonii* La1, Granato et coll. (1999) 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. Une mutation induite au niveau de l'opéron (*Dlt*) codant la protéine d'insertion des résidus D-alanine sur la chaîne de polyglycérol-phosphate des LTAs de *Lactobacillus reuteri* 100-2 a permis d'établir une corrélation étroite entre la diminution du degré de substitution de la chaîne hydrophile par les résidus D-alanine, et la capacité résiduelle de la souche *Lactobacillus reuteri* 100-2 à coloniser le tractus intestinal du rat (Walter *et al.* 2007).

Chez les bactéries pathogènes à Gram positifs, les LTAs sont depuis longtemps considérés comme des facteurs de virulence, compte tenu d'une certaine homologie structurale avec le LPS des

bactéries à Gram négatif, et de leur capacité à induire la production d'agonistes pro-inflammatoires (Ginsburg 2002). Ils peuvent être relargués dans le milieu au cours de la multiplication bactérienne, mais également à la suite d'une bactériolyse induite par du lysozyme, par des peptides cationiques provenant des leucocytes, ou par des antibiotiques de type β -lactame.

Etant donné le rôle des LTAs dans l'inflammation associée aux infections par les pathogènes, la communauté scientifique s'est rapidement intéressée à leur implication dans les effets immunomodulateurs des bactéries probiotiques. De nombreux effets sur le système immunitaire de l'hôte ont été attribués aux LTAs, aussi bien lorsque ceux-ci sont sous forme soluble qu'associés à la paroi bactérienne. Les mécanismes de reconnaissance des LTAs par les cellules de l'hôte restent cependant controversés, et la compréhension des rôles physiologiques de ces molécules reste incomplète. Comme la plupart des composants bactériens, les LTAs seraient des inducteurs de la voie NF- κ B (Opitz *et al.* 2001; Schröder *et al.* 2003). Ils sont généralement considérés comme des ligands aux TLR2 sous forme d'hétérodimères avec le TLR6, et avec CD14 et CD36 comme co-récepteurs (Nilsen *et al.* 2008). Après interaction avec les récepteurs, le complexe LTA/récepteur serait internalisé par les cellules de l'hôte vers l'appareil de Golgi (Triantafilou *et al.* 2004). Au niveau de l'intestin, l'interaction des LTAs avec les récepteurs cellulaires semblent être principalement assurée par les cellules présentatrices d'antigènes, comme les macrophages et les cellules dendritiques, car les cellules épithéliales intestinales sous-exprimeraient ces récepteurs afin de limiter la stimulation constante par ces ligands, présents de manière ubiquitaire dans la lumière intestinale (Melmed *et al.* 2003). Les effets immunomodulateurs des LTAs de bactéries probiotiques ont été principalement décrits chez des souches de *Lactobacillus*. Chez *Lactobacillus plantarum*, Kim *et coll.* (2007) ont mis en évidence des activités immunomodulatrices attribuées aux acides teichoïques et lipotéichoïques associés à la paroi bactérienne. *Lactobacillus plantarum* est l'un des résidents permanents du tractus intestinal de l'Homme. Il entretient des relations bénéfiques avec son hôte par la production de certains métabolites ou la stimulation de la production de cytokines spécifiques. Les LTAs extraits de *Lactobacillus casei* YIT9029 et *Lactobacillus fermentum* YIT0159 pourraient induire l'expression de TNF α par des macrophages via l'interaction avec le TLR2 (Matsuguchi *et al.* 2003). De plus, des LTAs extraits de *Lactobacillus plantarum* KCTC10887BP semblent être des antagonistes de la production de TNF induite par des LTAs de *Staphylococcus aureus* sur des monocytes, passant par la reconnaissance par les récepteurs TLR2 et CD14 (Kim *et al.* 2008).

Les différences structurales observées entre les LTAs de différentes souches pourraient modifier l'interaction avec les récepteurs et par conséquent, entraîner des différences dans la réponse immunitaire induite.

- Relation structure-activité des LTAs

Actuellement, des études de relation structure-activité sont nécessaires pour mettre en évidence le rôle exact de chaque domaine présent dans la structure des LTAs dans l'activité biologique de ces derniers. Cela a été étudié principalement étudié chez *Staphylococcus aureus* étant donnée l'implication de ce microorganisme dans les septicémies, tandis que les LTAs de bactéries probiotiques ont été principalement décrits chez le genre *Lactobacillus* (Grangette *et al.* 2005; Vélez *et al.* 2007; Mohamadzadeh *et al.* 2011). Les LTAs de *Staphylococcus aureus* pathogène et du probiotique *Lactobacillus plantarum* possèdent des propriétés immunomodulatrices différentes. La production de NO induite chez les cellules RAW 264.7 par les LTAs purifiés de *Lactobacillus plantarum* KCTC 10887BP a été décrite comme étant inférieure à celle des LTAs de *Staphylococcus aureus* pathogène, ce qui suggère que les effets observés sur le système immunitaire pourraient être principalement dus à des structures distinctes, caractéristiques de leurs LTAs respectifs (Ryu *et al.* 2009). Des analyses structurales de LTAs de *Lactobacillus plantarum* KCTC 10887BP ont révélé des différences majeures comparativement aux LTAs de *Staphylococcus aureus*. Ces différences concernent principalement la longueur et le degré de saturation de la chaîne acyle de l'ancre glycolipidique, ainsi que la nature des oses substituant la chaîne de poly(glycérol-phosphate) (Jang *et al.* 2011). L'ancrage lipidique semble jouer un rôle essentiel dans l'activité biologique des LTAs (Baik *et al.* 2011; Blanc *et al.* 2013; Hong *et al.* 2014), notamment parce que la chaîne acyle semble être impliquée dans la reconnaissance par le récepteur cellulaire TLR2 (Kang *et al.* 2009) nécessaire à l'induction de l'expression de facteurs inflammatoires (Morath *et al.* 2002). Toutefois, des études sur la relation structure-activité suggèrent que le taux de substitution de la chaîne hydrophile par la D-alanine est principalement responsable du potentiel immunomodulateur des LTAs. Outre le rôle de la D-alanine dans la viabilité cellulaire, l'adhérence aux surfaces ou la protection contre les peptides antimicrobiens cationiques (Chan *et al.* 2007; Fittipaldi *et al.* 2008), Morath et coll. (2001) ont démontré qu'une hydrolyse complète et spécifique des esters de D-alanine des LTAs de *Staphylococcus aureus* conduit à une diminution de la capacité de production de TNF α . En effet, la stimulation de macrophages par des LTAs de *Staphylococcus aureus* synthétisés chimiquement a suggéré qu'une réponse cellulaire importante dépendrait d'un haut degré de substitution par la D-alanine (Deininger *et al.* 2003). Le rôle de la D-alanine a déjà été confirmé par Grangette et coll. (2005) à l'aide d'un mutant de *Lactobacillus plantarum* synthétisant des LTA ayant une absence complète de substitutions par la D-alanine. Des niveaux significativement réduits de cytokines pro-inflammatoires, et des productions accrues de cytokines anti-inflammatoires ont été observées par rapport à la souche parentale (Grangette *et al.* 2005).

3

LES PREBIOTIQUES

1. Historique et définitions

Le concept de prébiotique a été proposé pour la première fois par Gibson et Roberfroid (1995). Un prébiotique est défini comme un « composé alimentaire spécifique non-digestible et non-absorbable dans l'intestin grêle, mais fermenté dans le gros intestin ». C'est au Japon, un pays où l'alimentation est particulièrement pauvre en fibres et végétaux, qu'est née cette idée. En effet, dans les années 80, diverses préparations de lait fermenté ont été supplémentées avec des oligosaccharides dits « bifidogènes », pour tenter de combattre cette carence. Cette notion de prébiotique a aujourd'hui une définition officielle selon la World Gastroenterology Organization : « Substance alimentaire peu ou pas digestible et qui affecte positivement la santé de l'hôte en stimulant sélectivement la croissance et/ou l'activité d'un nombre limité de bactéries du côlon » (WGO 2008). Cependant, cette définition est régulièrement amendée par la communauté scientifique, qui considère que les prébiotiques sont des substances alimentaires sélectivement fermentées, conduisant à des changements précis, à une modulation et à une stimulation sélective de la composition et de l'activité du microbiote intestinal, conférant des bénéfices sur la santé et le bien-être du consommateur (Roberfroid 2007).

Un composé prébiotique doit répondre à trois critères (Laparra et Sanz 2010):

- Résistance à la digestion par les enzymes de l'hôte et à l'acidité gastrique,
- Capacité à être fermenté par les bactéries du microbiote intestinal,
- Capacité à moduler l'activité et à stimuler la croissance de bactéries bénéfiques de l'intestin.

Les oligosaccharides (OS) ont été de plus en plus utilisés dans l'industrie alimentaire pour leurs propriétés fonctionnelles en tant qu'agents viscosant, émulsifiant, gélifiant, etc... De plus, l'addition d'OS prébiotiques aux aliments a été considérée comme sûre. Elle présente un intérêt nutritionnel et des effets sur la santé intéressants, tels qu'un pouvoir sucrant modéré, de faibles teneur en calories et en valeur glycémique, et une absence de cancérogénicité (Srinivasjois *et al.* 2009).

2. Structures et obtention des prébiotiques les plus connus

Du fait du métabolisme des bactéries intestinales, notamment lactiques, et des différentes enzymes digestives, les prébiotiques ne peuvent pas être de nature protéinique ou lipidique, mais plutôt glucidique (Cummings et Macfarlane 2002). La majorité des prébiotiques sont des oligosaccharides constitués d'enchaînements de 2 à 20 résidus de pentose ou d'hexose (Delzenne 2003). Plusieurs prébiotiques sont déjà commercialisés. L'inuline, les fructooligosaccharides, les galactooligosaccharides et le lactulose sont les plus connus (Al-Sheraji *et al.* 2013) :

- **L'inuline (Inu)** : polymère d'unités β -D-fructofuranosyle unis par liaisons osidiques $\beta(2\rightarrow1)$ avec un résidu glucose en position terminale ($10 < DP < 60$). On la retrouve dans de nombreux végétaux, mais elle est principalement extraite de racines de chicorée.
- **Les fructooligosaccharides (FOS)** : polymères de fructose comme l'inuline dont ils sont généralement issus après hydrolyse enzymatique partielle ($DP < 10$). Ils peuvent également être extraits directement de plantes, ou obtenus par synthèse enzymatique à partir de saccharose.
- **Les galactooligosaccharides (GOS)** : polymères d'unités galactose liées en $\alpha(1\rightarrow6)$, avec un résidu glucose-saccharose en position terminale ($3 < DP < 11$). Ils sont principalement produits à partir du lactose par l'action d'une β -galactosidase.
- **Le lactulose** : disaccharide galactose-fructose liés en $\beta(1\rightarrow4)$ obtenu à partir du lactose du lait. Il est connu pour ses effets laxatifs lorsqu'il est consommé à forte dose.

Un intérêt récent porté à la valorisation de produits d'origine naturelle, aux co-produits de l'agro-industrie, associé au progrès des biotechnologies, a conduit à la caractérisation de nouvelles sources de prébiotiques. Parmi ces prébiotiques émergents, on peut citer : les xylooligosaccharides, les oligosaccharides de soja et les isomaltooligosaccharides, et dans une moindre mesure les glucooligosaccharides.

- **Les xylooligosaccharides (XOS)** : polymères de xylose liés en $\beta(1\rightarrow4)$ qui sont généralement obtenus par hydrolyse d'hétéroxylanes présents dans la paroi de cellules végétales comme le son de blé ($1 < DP < 5$). On inclut également dans cette famille les arabinoxyloligosaccharides (AXOS).
- **Les oligosaccharides de soja (SOS)** : ils sont constitués de résidus glucose, galactose et fructose. Les deux SOS principaux sont le raffinose (trisaccharide) et le stachyose (tétrasaccharide) obtenus à partir de soja.

- **Les isomaltooligosaccharides (IMOS)** : polymères de glucose liés en α -(1→6) ($2 < DP < 10$). Ils sont obtenus par hydrolyse enzymatique de l'amidon de maïs grâce notamment à une α -amylase, et ce sont les oligosaccharides les plus produits au Japon. Toutefois, une partie des IMOS peut être digérée dans l'intestin par l'isomaltase humaine.

3. Mode d'action des prébiotiques et effets associés

Il y a aujourd'hui de nombreux travaux scientifiques sur l'utilisation des probiotiques, mais les connaissances sur l'utilisation des prébiotiques sont encore limitée, et les allégations santé concernant leur utilisation sont parfois infondées (de Vrese et Schrezenmeir 2008). Toutefois, de nombreuses études menées *in vivo* et *in vitro* ont montré que la consommation de prébiotiques pourrait avoir des avantages non-négligeables sur la santé et le bien-être du consommateur. En effet, les prébiotiques pourraient influencer l'absorption des minéraux (notamment le calcium). D'autres avantages ont été décrits : propriétés anticancéreuses potentielles, rôle dans le métabolisme des lipides, et effets immunomodulateurs (Macfarlane *et al.* 2008).

Les effets physiologiques des prébiotiques sont liés à leur structure moléculaire et à leur capacité à être fermentés par des bactéries commensales de l'intestin. Les bénéfices potentiels des prébiotiques sont attribués à deux mécanismes principaux:

- La reconnaissance directe de la structure de l'oligosaccharide par les cellules de la muqueuse intestinale conduisant à un renforcement de la barrière intestinale et la stimulation du système immunitaire,

- La fermentation par les microorganismes commensaux favorisant ainsi leur développement. Cela conduit à l'inhibition des pathogènes par différents mécanismes : (i) par compétition pour la source de carbone/d'énergie et pour les sites d'adhésion, (ii) par la production de substances antimicrobiennes, (iii) par la production d'acides gras à chaîne courte (iiii) et par un renforcement de la barrière intestinale et une immunomodulation après interaction avec ces bactéries. Ces mécanismes sont résumés dans la Figure 12.

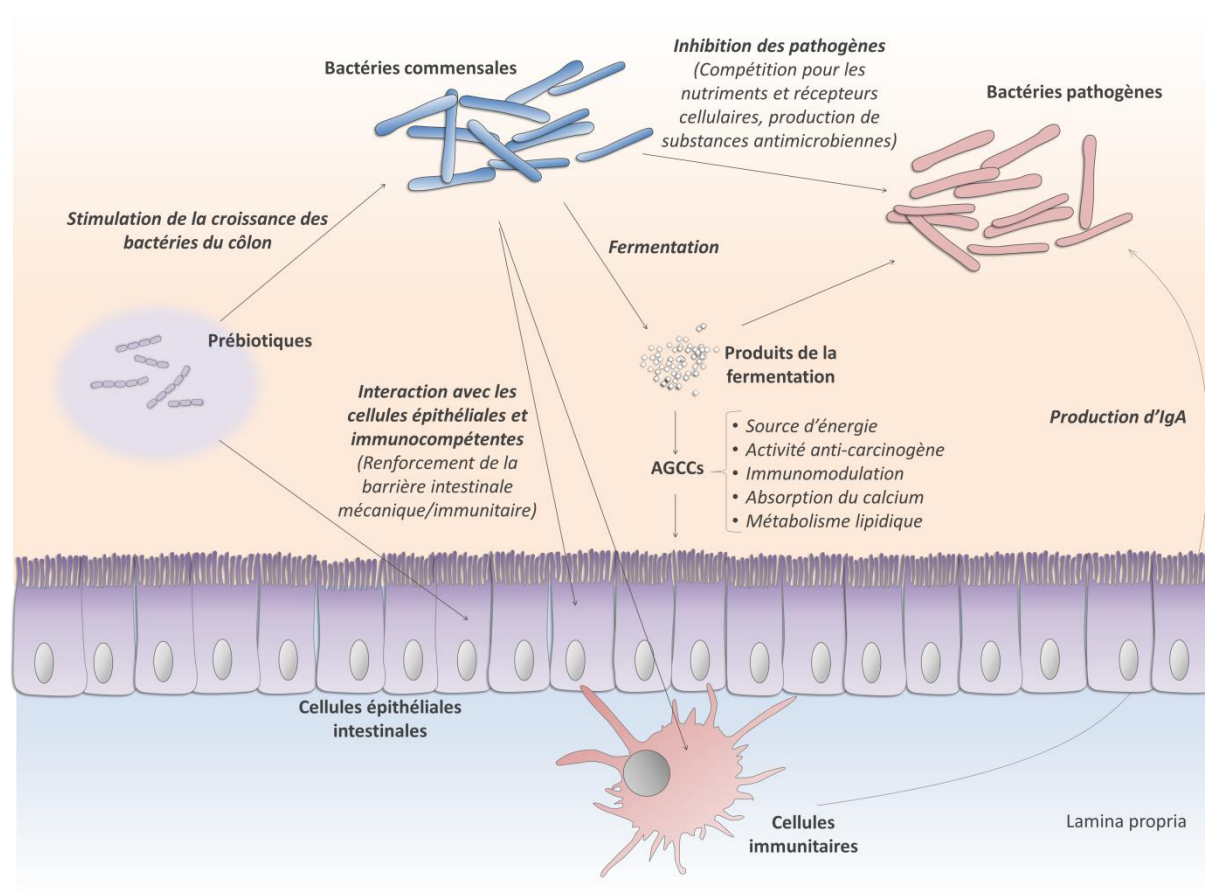


Figure 12: Mécanismes d'action et principaux effets associés à la consommation de prébiotiques (adapté de Saad *et al.* 2014)

3.1. Effets sur la composition et l'activité de la flore du tractus intestinal

Chez l'Homme, plus de 1000 espèces bactériennes résident dans le côlon, avec une population comprise entre 10^{11} et 10^{12} UFC/g de matière fécale. Parmi elles, les bactéries ayant un métabolisme saccharolytique exclusif peuvent être considérées comme bénéfiques pour l'hôte en raison de leur fonction métabolique et des produits finaux obtenus. Cette fonction métabolique d'intérêt est notamment retrouvée chez les lactobacilles et les bifidobactéries, deux genres bactériens importants du microbiote intestinal humain. Ils ont pour cette raison été considérés initialement comme les cibles principales des prébiotiques. On sait aujourd'hui que l'activité d'autres genres bactériens peut être stimulée, comme chez le genre *Clostridium* par exemple. Néanmoins, malgré la diversité des oligosaccharides prébiotiques, les bifidobactéries et, dans une moindre mesure, les lactobacilles, restent les bactéries qui répondent le mieux à la stimulation par les prébiotiques (Gibson *et al.* 1996),

tandis que la flore potentiellement pathogène (entérobactéries, clostridies, salmonelles,...) n'utilise que peu ces composés. Par conséquent, les prébiotiques pourraient contribuer à maintenir l'homéostasie du microbiote, en stimulant la croissance des bactéries lactiques ou d'autres groupes bactériens présents dans le côlon. De plus, ces dernières pourraient créer des conditions défavorables au développement des espèces pathogènes, notamment par la diminution du pH luminal, conduisant à une inhibition de leur développement (Fabre 2004).

Les modifications physiologiques du métabolisme bactérien induites par l'utilisation de prébiotiques peuvent jouer un rôle aussi important que les changements de composition du microbiote dans l'induction d'effets bénéfiques sur la santé. La fermentation des prébiotiques par les bactéries intestinales conduit à la formation d'hydrogène, de dioxyde de carbone et d'AGCCs.

Les AGCCs sont définis comme des acides gras volatiles possédant 1 à 6 carbones, dont la conformation peut être linéaire ou branchée. Les AGCCs les plus communs sont les acides formique, acétique, propionique, butyrique, isobutyrique, valérique, isovalérique, et caproïque (Soldavini et Kaunitz 2013). La production d'AGCCs est l'un des processus physiologiques les plus importants induits par les microorganismes du côlon, avec les oligosaccharides comme précurseurs majeurs (Soldavini et Kaunitz 2013). La synthèse des AGCCs entraîne une diminution de pH qui inhibe certains agents pathogènes, tandis que les bifidobactéries et les lactobacilles sont tolérants à cette acidification. Cette acidification permettrait également de favoriser l'absorption du Ca^{2+} et Mg^{2+} (Scholz-Ahrens *et al.* 2007). L'acétate, le propionate, et le butyrate constituent 90 à 95% des AGCCs présents dans le côlon (Mortensen et Clausen 1996). Le rapport molaire acétate/propionate/butyrate est estimé à 60:20:20 dans les différentes régions du côlon. Les différences dans le taux de production des AGCCs dépendent essentiellement de la nature des substrats et de la composition de la flore intestinale. Bien que les mécanismes restent encore peu compris, plus de 95% des AGCCs produits sont absorbés par le côlon, ce qui représente environ 5 à 10% de l'énergie nécessaire aux colonocytes (McNeil 1984; Andoh *et al.* 2003). Les AGCCs, et notamment le butyrate, possèdent des propriétés anti-inflammatoires et cicatrisantes. Le butyrate est l'un des substrats majeurs des cellules de la muqueuse colique. Il stimule la croissance des cellules épithéliales (Davie 2003). Le Tableau 6 résume les principaux effets potentiels des AGCCs observés sur la santé.

Nature de l'AGCC	Effets physiologiques	Références
Acetate	Métabolisé dans les muscles, les reins et le cœur	
	Augmentation de la production d'anticorps circulants et de l'activité des cellules NK	(Ishizaka <i>et al.</i> 1993)
	Réduction de la concentration lipidique dans le sérum	(Roberfroid 2005)
Propionate	Métabolisé dans le foie	
	Substrat potentiel pour la néoglucogenèse	(Reshef <i>et al.</i> 1967)
	Inhibiteur de la synthèse de cholestérol	
	Propriétés anti-inflammatoires	
Butyrate	Substrat énergétique majeur pour les cellules épithéliales du côlon	(Davie 2003)
	Affecte la prolifération, la différenciation et l'expression génique des cellules épithéliales du côlon	
	Facteur de protection contre les carcinomes via la stimulation de l'apoptose	(Rowland <i>et al.</i> 1998; Scheppach et Weiler 2004)
	Réduction de la production de cytokines pro-inflammatoires et augmentation de la production de cytokines anti-inflammatoires via l'induction de la voie NF-κB par des cellules d'adénocarcinome colique (HT-29)	(Inan <i>et al.</i> 2000)

Tableau 6: Principaux effets des AGCCs sur la santé (traduit de Saad *et al.* 2014)

3.2. Effets sur le système immunitaire

Les aliments sont les principaux facteurs susceptibles d'influencer la composition et la production de métabolites microbiens dans le tractus gastrointestinal, ce qui rend l'utilisation des prébiotiques prometteuse pour « l'amélioration de la santé et du bien-être de l'hôte ». Les prébiotiques pourraient exercer des effets immunomodulateurs directs ou indirects, et provoquer des changements la composition du microbiote. La réponse immunitaire innée pourrait être activée par l'interaction directe des oligosaccharides avec des récepteurs des cellules hôtes, en particulier des macrophages et des cellules dendritiques.

L'administration, par voie orale, d'inuline et de FOS, pourrait moduler les fonctions du système immunitaire :

- Sécrétion d'IL-10 et d'interféron (IFN- γ) dans les plaques de Peyer (Hosono *et al.* 2003),
- Augmentation de l'activité des cellules immunitaires,
- Prolifération des lymphocytes (Hoentjen *et al.* 2005),
- Augmentation de la production d'IgA et de l'expression de récepteurs à immunoglobuline polymérique (pIgR), à la fois dans l'intestin grêle et le côlon chez les souris (Nakamura *et al.* 2004),
- Développement du GALT (Pierre *et al.* 1997).

Les moyens par lesquels les prébiotiques peuvent exercer leurs effets sur le système immunitaire, et moduler les tissus lymphoïdes associés, incluent l'accroissement de la production d'AGCCs, et l'augmentation du nombre des bactéries immunogènes tels que les lactobacilles et les bifidobactéries. La stimulation de la croissance des bactéries productrices d'AGCCs peut modifier les motifs moléculaires associés à la surface des microorganismes dans la lumière de l'intestin, conduisant à une activation de la voie NF- κ B et à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Saad *et al.* 2014).

Dans le cas de maladies inflammatoires de l'intestin, comme la maladie de Crohn ou les colites ulcéreuses, la flore intestinale semble héberger qu'un nombre réduit de bifidobactéries (Frank *et al.* 2007). Normalement, la tolérance immunitaire aux bactéries commensales et la réponse contre les bactéries pathogènes est maintenue par un équilibre entre cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires des tissus lymphoïdes associés à l'épithélium intestinal. Dans le cas spécifique des MICI, une production déséquilibrée de cytokines inflammatoires pourrait être liée à la composition du microbiote. Utiliser des prébiotiques comme agents thérapeutiques pour restaurer l'homéostasie immunitaire normale, dans le cas de maladies inflammatoires de l'intestin, est un concept prometteur. Quelques études ont été réalisées avec des prébiotiques, principalement l'inuline et les FOS, dans l'objectif de lutter contre des pathologies humaines. L'inuline pourrait réduire l'inflammation, tandis que les FOS pourraient accroître la production d'IL-10, ainsi que l'expression du TLR2 et du TLR4 dans les cellules dendritiques (Welters *et al.*, 2002; Lindsay *et al.*, 2006.). Une seule étude clinique en double aveugle a été réalisée avec un prébiotique sur des maladies inflammatoires de l'intestin, plus précisément sur vingt patients atteints de pouchite. Les résultats ont montré que la consommation d'inuline pendant trois semaines, à raison de 24 g par jour, réduit l'inflammation associée à la pouchite, diminue le pH fécal, et augmente la concentration en butyrate dans les selles (Welters *et al.* 2002).

Le lien entre le microbiote colique et les phénomènes allergiques semble être fondamental. En effet, des études ont montré qu'une plus faible population de bifidobactéries, et ayant des propriétés

d'adhésion réduites, sont retrouvées dans les matières fécales des nourrissons atteints d'allergies comparativement à ce qui est observé chez des enfants sains (He *et al.* 2001; Kirjavainen *et al.* 2002). L'utilisation de prébiotiques dans des cas d'allergies peut modifier la composition du microbiote intestinal, en stimulant la croissance des bifidobactéries commensales. Cela conduirait à un rééquilibrage de la réponse immunitaire et à l'augmentation de la production de cytokines anti-inflammatoires (IL-10 et TGF- β) (Kelly *et al.* 2005).

3.3. Autres effets

L'absorption du calcium régie par la vitamine D, est nécessaire à l'augmentation de la minéralisation des os, principalement au cours de la puberté. Etant donné les effets attribués au lactose dans l'absorption du calcium, des effets similaires par d'autres oligosaccharides dérivés du lactose, tels que les GOS, peuvent être envisagés. Afin de répondre aux problèmes de minéralisation des os, plusieurs études utilisant l'inuline et les FOS chez l'Homme ont abouti à des résultats encourageants, avec l'observation d'amélioration de l'absorption du calcium et de l'augmentation de la densité minérale osseuse (Macfarlane *et al.* 2006).

L'alimentation semble également jouer un rôle important dans l'étiologie du cancer colorectal. Toutefois, les données ne sont pas suffisantes pour conclure que les constituants de l'alimentation (par exemple la viande, les légumes, les fibres, ...) exercent un effet sur les risques. Certaines études supposent que le microbiote cœlique est impliqué dans la formation de tumeurs cancéreuses. En effet, les résidus alimentaires non absorbés sont utilisés pour le métabolisme bactérien dans le côlon, ce qui pourrait conduire à la production d'agents cancérogènes par certaines souches commensales. Une modification de la composition de la microflore intestinale pourrait interférer avec le processus de cancérogenèse. Une augmentation du nombre de lactobacilles et de bifidobactéries consécutive à l'ingestion de prébiotiques, est considérée comme une voie intéressante à explorer. Plusieurs hypothèses concernant les effets potentiels des prébiotiques sur la diminution des facteurs de risque de cancer colorectal, appuyées par des études *in vitro* et *in vivo*, ont été proposées (Lee et Salminen 2009) :

- l'augmentation de la production d'AGCCs (en particulier le butyrate) induit la différenciation et l'apoptose des cellules épithéliales du côlon,
- la réduction de l'activité d'enzymes mutagènes (par exemple les β -glucuronidases et azoréductases),
- la réduction de la production de métabolites bactériens associés à un risque de cancer du côlon (par exemple les phénols, les indoles, les acides biliaries secondaires).

La capacité de prébiotiques à contribuer de manière significative à la réduction de l'incidence du cancer colorectal chez l'Homme reste à prouver. Cependant, des expériences préliminaires sur l'Homme et l'animal fournissent des résultats prometteurs (Lee et Salminen 2009).

Enfin, des études réalisées sur des modèles animaux ont montré des effets convaincants des prébiotiques sur le métabolisme lipidique hépatique. À la suite de la consommation d'inuline et de FOS, une réduction significative du taux de cholestérol et de triglycérides chez le rat a été observée, avec une diminution de 15% et 50% respectivement (Delzenne *et al.* 2002). Ces effets sont dus à la réduction de l'activité des enzymes lipogéniques. Cependant, les résultats des essais chez l'Homme sont plus controversés. Les résultats les plus significatifs ont été obtenus avec de l'inuline, ils mettent en évidence une diminution de la triglycéridémie, et une faible réduction de la cholestérolémie (Roberfroid, 2005).

Si les prébiotiques permettent la stimulation spécifique de la croissance de bactéries dans l'intestin comme les lactobacilles ou les bifidobactéries, la communauté scientifique s'est rapidement intéressée aux possibles effets de l'association entre une souche probiotique des genres *Lactobacillus* ou *Bifidobacterium*, et un substrat prébiotique, dans l'objectif de favoriser l'implantation du probiotique dans l'intestin. Ce concept, appelé synbiotique, est présenté dans la dernière partie de cette étude bibliographique.

4

Effet des prébiotiques sur les probiotiques : concept de synbiotique

1. Définitions

Pour exercer leurs effets, les probiotiques doivent généralement entrer en compétition avec les microorganismes déjà présents dans le tractus intestinal, notamment pour les nutriments, tandis que les prébiotiques utilisés seuls, peuvent uniquement affecter la croissance des bactéries indigènes. Afin d'améliorer l'effet de chacun, la combinaison de probiotiques et de prébiotique est un concept d'intérêt. Andersson et coll. (2001) ont défini les synbiotiques comme « un mélange de probiotiques et de prébiotiques qui affecte de manière positive la santé de l'hôte, en augmentant la survie et l'implantation de microorganismes vivants, présents dans un complément alimentaire, dans le tractus gastro-intestinal de l'hôte ». Ce concept a été validé par l'AFSSA en 2003, mais si une telle relation est possible, elle doit être scientifiquement démontrée.

2. Synbiotiques commerciaux et effets sur la santé

On peut distinguer deux types d'effets sur la santé différents lors de la consommation d'un synbiotique :

- soit un effet additionnel des effets du prébiotique et du probiotique,
- soit un effet synergique comme le laisse entendre la définition initiale.

De nombreuses études, menées à la fois *in vitro* et *in vivo*, ont permis de mettre en évidence les effets bénéfiques des probiotiques et des prébiotiques sur la santé humaine, mais malheureusement, seul un faible nombre d'études ont porté sur les effets synergiques de l'administration simultanée de probiotiques et prébiotiques. Les deux principaux synbiotiques commercialisés et leur composition sont présentés dans le Tableau 7.

Synbiotique	Souches probiotiques	Oligosaccharides prébiotiques	Fournisseur	Références
				(Rayaes <i>et al.</i> 2005;
Synbiotic 2000 et Synbiotic Forte	<i>Pediococcus pentosaceus</i> 5-33:3, <i>Leuconostoc mesenteroides</i> 32-77:1, <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 19, <i>Lactobacillus plantarum</i> 2362	β -glucan, inuline, pectine et amidon résistant	Medipharm AB, Suède	Kotzampassi <i>et al.</i> 2006; Bengmark 2010)
Probiostim [®]	<i>Lactobacillus Rosell</i> -52, <i>Bifidobacterium Rosell</i> -71 <i>Bifidobacterium Rosell</i> -33	FOS	Institut Rosell-Lallemand, Canada	(Knight <i>et al.</i> 2009)

Tableau 7: Synbiotiques commerciaux et leur composition (Adapté de Saad *et al.* 2014).

Quelques études portent néanmoins sur les effets de différents mélanges de prébiotiques et de probiotiques, notamment sur la modification de la flore intestinale, l'immunomodulation, la prévention de cancers, et la prévention des septicémies (de Vrese et Schrezenmeir 2008). Bengmark et son équipe ont réalisés plusieurs études cliniques avec les préparations Synbiotic 2000[®] et Synbiotic 2000[®] Forte. Le choix de bactéries productrices d'acide lactique pour la formulation était basé sur leur capacité à produire des protéines bioactives, à induire la voie NF- κ B, à stimuler la production de cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires (Bengmark 2008). Le Tableau 8 regroupe les effets bénéfiques obtenus avec les produits Synbiotic 2000[®] et Synbiotic 2000 Forte[®] (Bengmark 2010).

Pathologie	Effets sur la santé	Références
Pancréatite aiguë	Réduction du nombre d'infections après 14 jours de traitement	(Olah <i>et al.</i> 2007)
Polytraumatisme	Réduction du nombre d'infections post-opératoires	(Spindler-Vesel <i>et al.</i> 2007)
	Réduction du nombre de globules blanc, de LPS et de protéine C réactive dans le sang des patients n'ayant pas développé d'infection	(Giamarellos-Bourboulis <i>et al.</i> 2009)
Chirurgie abdominale (cancer)	Réduction du nombre d'infections post-opératoires	(Rayes <i>et al.</i> 2005)
Maladies inflammatoires chroniques (colites)	Réduction drastique des épisodes de diarrhée et des saignements	(Pathmakanthan <i>et al.</i> 2002)
	Augmentation de la consistance des selles	

Tableau 8: Principaux résultats obtenus avec les produits Synbiotic 2000 et Forte 2000 (adapté de Bengmark *et al.* 2010)

Néanmoins, deux études réalisées avec Synbiotic 2000[®], sur des maladies inflammatoires de l'intestin, se sont conclues par des résultats négatifs (Rutgeerts *et al.* 2004). D'autres synbiotiques ont été testés chez l'Homme, notamment pour le traitement du syndrome de l'intestin irritable, mais il subsiste encore un manque de preuves pour garantir leur efficacité (Ford *et al.* 2014).

Les résultats obtenus avec les synbiotiques sont encore trop peu nombreux pour conclure quant à leurs effets bénéfiques. Cela est dû au fait que d'une part, il manque encore aujourd'hui des informations concernant les pathologies intestinales à traiter, et d'autre part, que les mécanismes associés à la consommation de synbiotiques sont pratiquement inconnus, la plupart des études réalisées étant des essais cliniques. Tout comme pour les probiotiques et les prébiotiques, la compréhension du mode d'action de chacun des acteurs est absolument nécessaire afin d'optimiser leur utilisation.

Objectifs des travaux

Les données bibliographiques concernant les probiotiques font état d'effets bénéfiques souvent prouvés. Cependant les mécanismes moléculaires qui sont à l'origine de ces effets restent mal compris. L'interaction entre les molécules de la paroi du microorganisme et les cellules de l'intestin représente une étape clé dans la modulation du système immunitaire. Il est nécessaire aujourd'hui, d'essayer d'élucider ces mécanismes, afin d'optimiser l'utilisation de ces bactéries probiotiques. Le genre *Bacillus*, utilisé en tant que probiotique, présente un intérêt majeur de par sa capacité à résister aux conditions de l'estomac sous forme de spores, et à germer une fois dans l'intestin. Mais malgré cette résistance, la persistance de la souche dans l'intestin est plus limitée que celle observée pour les genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, déjà présents dans la flore indigène et donc adaptés à de telles conditions.

Dans une première partie du travail consacré à cette thèse, nous proposons d'étendre le concept de synbiotique au genre *Bacillus*, car jusqu'à lors il ne concernait que des bactéries des genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. Etant donnée la capacité des spores de *Bacillus* à passer sous forme végétative une fois dans l'intestin, lorsque l'apport nutritionnel est favorable, nous avons souhaité vérifier si l'addition d'un substrat prébiotique, peu digéré par les enzymes intestinales, serait susceptible de favoriser la germination des spores de *Bacillus*. Pour cela, la croissance de la souche probiotique *Bacillus subtilis* CU1, commercialisée par la société Lesaffre, a été suivie dans un premier temps avec neuf oligosaccharides prébiotiques différents comme unique substrat carboné. La capacité de développement de la souche sur un substrat isomaltooligosaccharide (IMOS), polymère d'unités glucose liées en $\alpha(1\rightarrow4)$ et $\alpha(1\rightarrow6)$ dérivé de l'amidon, a justifié la suite de l'étude vers ce prébiotique. L'investigation du potentiel synbiotique de l'association *B. subtilis* CU1/IMOS a ensuite été menée *in vitro*. Les cinétiques de croissance de la souche *B. subtilis* CU1 avec les IMOS comme unique substrat carboné ont été déterminées et comparées à celles obtenues avec le glucose. La production d'acides gras à chaînes courtes a été suivie au cours de la croissance, parallèlement à la mesure de l'utilisation des sources carbonées présentes dans le milieu surnageant. Une analyse comparée par électrophorèse bidimensionnelle, du protéome total de *B. subtilis* CU1 après croissance sur IMOS et sur glucose a été réalisée. L'analyse protéomique constitue une approche préliminaire pour comprendre les fonctions biologiques des protéines sur- ou sous-exprimées en présence d'IMOS. L'identification de ces protéines présente un réel intérêt, aussi bien pour la compréhension de leurs fonctions métaboliques dans la dégradation du prébiotique, que pour l'élucidation de leurs potentielles propriétés impliquées dans les effets bénéfiques associées au probiotique. La présence de bile dans le haut de l'intestin peut être un facteur limitant de germination de *B. subtilis*. Aussi, l'influence des

IMOS sur la tolérance à la bile a été évaluée par détermination des cinétiques de croissance en présence et absence de bile. Cette étude *in vitro* représente un travail préliminaire qui a pour objectifs principaux de mesurer l'incidence d'un substrat carboné sur le développement de la souche une fois dans l'intestin, et d'aborder la compréhension des mécanismes impliqués, avant de pouvoir envisager ultérieurement une étude *in vivo*.

Dans un deuxième volet des travaux de thèse, nous nous sommes intéressés à l'interaction entre la bactérie probiotique et l'hôte, et plus précisément au rôle des acides lipotéichoïques dans les mécanismes moléculaires impliqués lors de cette interaction. L'utilisation optimale des probiotiques nécessite que les mécanismes à l'origine de leurs effets soient connus. Les molécules de la paroi bactérienne jouent un rôle clé dans ces mécanismes. L'activité immunomodulatrice des LTAs peut être associée à leur présence importante au niveau de la paroi des bactéries à Gram positif, en faisant ainsi des acteurs majeurs de l'interaction entre un probiotique du genre *Bacillus* et l'hôte. On peut les retrouver sous deux formes, soit *in situ* dans la paroi, soit sous forme soluble dans le milieu, relargués consécutivement aux divisions bactérienne lors de la croissance. Plusieurs études rapportent le rôle fondamental de la structure des LTAs dans leur activité biologique, mais les fonctions de chacun des motifs moléculaires constitutifs de leur structure restent à démontrer. Dans cette seconde partie du travail, une comparaison de la structure et de l'activité biologique des LTAs extraits de trois souches probiotiques du genre *Bacillus* a été proposée. Pour atteindre cet objectif, les LTAs ont été extraits et purifiés de la paroi de *Bacillus cereus* CH, *Bacillus subtilis* CU1 et *Bacillus clausii* O/C, trois souches commercialisées en tant que probiotiques. Les structures de chacun des LTAs extraits ont été établies en combinant une analyse spectroscopique par RMN ^1H avec des dosages biochimiques. L'activité immunomodulatrice de chacun des LTAs a été déterminée sur différents modèles cellulaires et par différentes méthodes de caractérisation. L'objectif à plus long terme serait d'établir une relation structure-activité de ces constituants de la paroi bactérienne. Le rôle des résidus D-alanine, liés à la chaîne glycérol-phosphate dans l'activité immunomodulatrice des LTAs, n'est pas clairement établi. Les esters de D-alanine présents dans la structure de LTAs extraits de chacun des *Bacilli* ont été hydrolysés spécifiquement par voie chimique. La modification a été contrôlée par RMN ^1H et l'activité immunomodulatrice des LTAs ainsi déalanylés a été mesurée sur des macrophages murins RAW 264.7. Ce volet du travail s'inscrit dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans l'activité immunomodulatrice de souches probiotiques du genre *Bacillus*, et plus largement dans la compréhension de l'interaction bactérie-hôte.

Partie B

Matériel et Méthodes

Plan de la partie

Evaluation du potentiel synbiotique d'une association de la souche probiotique *B. subtilis* CU1 avec un substrat prébiotique de type isomaltooligosaccharide

1. Oligosaccharides prébiotiques
2. Analyse des oligosaccharides par spectrométrie de masse
3. Souches bactériennes
4. Milieux de culture
5. Conditions de culture
6. Etablissement des courbes de croissance
7. Numération bactérienne
8. Analyse des oligosaccharides par chromatographie en phase liquide
9. Détermination des activités glycohydrolasiques
10. Dosage des acides gras à chaîne courte et de l'acide lactique
11. Test d'adhésion sur cellules Caco-2
11. Analyse du protéome de *B. subtilis* CU1 par électrophorèse bidimensionnelle

Etude la relation structure-activité des acides lipotéichoïques de trois souches probiotiques du genre *Bacillus*

1. Souches bactériennes
2. Conditions de culture
3. Extraction et purification des acides lipotéichoïques (LTAs)
4. Caractérisation chimique des LTAs
5. Caractérisation structurale des LTAs par RMN ¹H
6. Détermination de l'activité biologique des LTAs

1

Evaluation du potentiel synbiotique d'une association de la souche probiotique *B. subtilis* CU1 avec un substrat prébiotique de type isomaltooligosaccharide

1. Oligosaccharides prébiotiques

Les oligosaccharides prébiotiques utilisés dans cette étude ont été sélectionnés auprès de divers fournisseurs. Ils sont présentés dans le Tableau 9 :

Oligosaccharide	Fournisseur	Pureté
Inuline	Orafti (Belgique)	99%
Fructooligosaccharides (FOS)	Actilight [®] , Beghin Meiji (France)	95%
Galactooligosaccharides (GOS)	Nanjing Zelang (Chine)	99%
Lactulose	Duphalac [®] , Solvay Pharma (Belgique)	66,5
Glucooligosaccharides (GlcOS)	Solabia (France)	> 90%
Oligosaccharides de soja (SOS)	Nanjing Zelang (Chine)	80%
Xylooligosaccharides (XOS)	Cornelius (France)	70%
Arabinoxyloligosaccharides (AXOS)	Fugeia (Belgique)	> 70%
Isomaltooligosaccharides (IMOS)	Nanjing Zelang (Chine)	99%

Tableau 9: Liste des oligosaccharides commerciaux utilisés au cours de cette étude.

Chaque oligosaccharide est préparé à 20% (p/v) dans l'eau et filtré stérilement sur filtre de cellulose 0,45 µm.

2. Analyse des oligosaccharides par spectrométrie de masse

L'ensemble des analyses de spectrométrie de masse sont réalisées en collaboration la plateforme INRA UR1268 IBiSA BIBS « BIopolymères, Biologie Structurale » de Nantes.

2.1. MALDI-MS

La structure des oligosaccharides prébiotiques sélectionnés sont déterminées par MALDI-MS comme décrit par Ropartz et coll. (2011). Les mesures de masse sont effectuées sur un spectromètre Autoflex III MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics, Allemagne) équipé d'un laser Smartbeam (355 nm, 200 Hz) en mode d'ionisation positif ou négatif, et avec un mode de détection linéaire ou réflecteur.

L'oligosaccharide solubilisé à 1 mg/mL dans de l'eau est mélangé avec la matrice DMA/DHB dans un rapport 1:1 (v/v). 1 µL de mélange est déposé sur une plaque en acier poli pour analyse MALDI. En mode linéaire, la plage masse/charge (m/z) est fixée entre 2000 et 10000, tandis qu'elle est fixée entre 450 et 3000 en mode réflecteur. L'intensité du laser est fixée 1000 U.A., avec un temps d'acquisition de 5 s. L'étalonnage de l'instrument est effectué systématiquement, avant toute nouvelle série d'analyses, avec des galactomannanes (DP3 à DP13) en mode réflecteur, et des IMOS (DP 3 à DP 50) en mode linéaire. Les spectres de masse sont traités automatiquement par le logiciel d'analyse Flex 3.0 (Bruker Daltonics, Allemagne) et seuls les ions avec un rapport signal sur bruit (S/N) supérieur à 5 sont considérés. Les résultats sont analysés avec le logiciel d'analyse Flex Analysis 3.0 (Bruker Daltonics, Allemagne).

2.2. ESI-MS

Afin de connaître les liaisons entre les unités glucoses des IMOS, ces derniers sont analysés par ESI-q-TOF (Ropartz *et al.* 2011). Pour cela, une fraction d'IMOS de DP 6 obtenue par chromatographie liquide sur colonne Rezex[®] (voir section 8.1), est infusée en Electrospray à une concentration de 50 µg/mL. L'échantillon est introduit à un débit de 5 µL/min (solvant/méthanol/eau 1:1 (v/v)) dans un système Synapt G2 Si HDMS (Thermo Fischer Scientific, USA). Les mesures sont effectuées dans les modes d'ionisation positifs et négatifs. Les fragments sont produits et mesurés dans

la cellule de collision/transfert de l'appareil. Les spectres sont enregistrés pendant 30s (régime DIC¹ basse énergie). L'énergie de collision est fixée sur la base du rapport signal/bruit observé pour les fragments. Les données acquises sont enregistrées et traitées à l'aide du logiciel MassLynx 4.1 (Waters, USA).

3. Souche bactérienne

Bacillus subtilis CU1 est la souche probiotique utilisée dans cette section. Elle a été isolée au Laboratoire de Microbiologie UMR CNRS 5248 de Bordeaux-Sciences Agro à partir de la préparation Probis[®] commercialisée par la société Lesaffre (France). La souche est conservée à -80°C sur des microbilles en présence de glycérol à 18% (v/v).

4. Milieux de culture

La croissance de la souche de *B. subtilis* CU1 est initiée en milieu liquide de Mueller-Hinton (MH) (Biokar Diagnostics/Solabia-Pantin, France) en aérobiose, à 37°C, sous agitation à 150 rpm. Le milieu MH est constitué de 17,5 g/L d'hydrolysate acide de caséine, 2 g/L d'infusion de viande et 1,5 g/L d'amidon soluble.

Les expérimentations sont réalisées en milieu minimum dont la composition pour 1L est détaillée ci-dessous :

Ingrédients	Masse (g)
K ₂ HPO ₄	2,5
KH ₂ PO ₄	2,5
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
MnSO ₄ .7H ₂ O	0,007

Tableau 10: Composition du milieu minimum utilisé pour la croissance des souches de *Bacillus*.

¹ Dissociation induite par collision

Le milieu de culture est autoclavé pendant 15 min à 121°C avant l'addition des oligoéléments (MgSO₄, FeSO₄ et MnSO₄). La source carbonée est préparée à 20% (p/v) et filtrée stérilement sur 0,45 µm, puis additionnée au milieu minimum à une concentration finale de 1% (p/v).

5. Conditions de culture

Le milieu minimum est ensemencé à 1% (v/v) à partir d'une préculture de *B. subtilis* CU1 réalisée avec la source carbonée glucose ou IMOS correspondante. Les croissances sont réalisées en aérobiose à 37°C, sous agitation à 150 rpm (Cenci *et al.* 2006).

6. Etablissement des courbes de croissance

6.1. En absence de bile

Les souches de *Bacillus* ont pour la plupart tendance à former des agrégats, ce qui rend les mesures de turbidité et les dénombrements difficiles. L'établissement des courbes de croissance n'est donc pas réalisable en mode automatique en plaque multi-puits, il nécessite de réaliser régulièrement des prélèvements manuels dans la culture. Les cinétiques de croissance de *B. subtilis* CU1 sont établies en inoculant le milieu minimum avec une préculture de 12h, à raison de 1% (v/v). Les cultures sont réalisées en erlenmeyer de 100 mL contenant 20 mL de milieu. Un prélèvement est effectué toutes les heures pendant 24h afin de réaliser (i) une analyse de la turbidité de la suspension bactérienne par mesure de l'absorbance à 595 nm, (ii) un dénombrement sur milieu gélosé par la méthode Spiral[®] (Interscience, France) et (iii) une coloration des bactéries par la méthode de Gram.

6.2. En présence de bile

En présence de bile, la capacité d'agrégation de la souche est inhibée. Le suivi de croissance est réalisé en plaques 48 puits (Cellstar[®], Greiner Bio-One, France). La bile bovine (Oxgall, Sigma-Aldrich, USA), contenant à la fois des sels biliaires conjugué et déconjugués, est préparée à 10% (p/v) dans de l'eau et filtrée stérilement sur 0,45 µm (pH 8), puis additionnée au milieu de culture à raison de 0,5% ou 1% (p/v) comme cela a été décrit précédemment (Cenci *et al.* 2006). Les cinétiques de croissance des cellules végétatives sont réalisées en inoculant 400 µL de milieu minimum avec 1% (v/v) d'une préculture en glucose ou IMOS en fin de phase exponentielle. L'obtention des spores est

réalisée à partir d'une préculture de 24 h, centrifugée à 8000 rpm pendant 5 min, puis reprise en milieu minimum non-supplémenté en source carbonée, et incubée 20 min à 70°C. Après avoir laissé la suspension reposer 20 min à température ambiante, 400 µL de milieu minimum est inoculé avec 1% (v/v) de la suspension de spores en présence de 0,5% ou 1% (v/v) de bile, et 1% (v/v) de source carbonée glucose ou IMOS.

Le suivi de croissance se fait par mesure de la turbidité à 595 nm toutes les heures à l'aide d'un lecteur de microplaques FLUOstar Omega (BMG Labtech, Allemagne). La température de l'enceinte est fixée à 37°C, et l'agitation continue de la plaque à 200 rpm.

7. Numération bactérienne

Les numérations bactériennes ont été réalisées par un dénombrement sur gélose par la méthode Spiral[®]. L'appareil utilisé est un SpiralSystem (Interscience, France). Les prélèvements sont dilués au dixième en cascade, jusqu'à une dilution de 10⁻⁴. L'appareil ensemence 49,7 µL de chacune des dilutions sur milieu gélosé. Le nombre d'UFC/mL est déterminé après 12 h d'incubation à 37°C, par comptage direct du nombre de colonies comme décrit par le fournisseur et prise en compte du facteur de dilution.

8. Analyse des oligosaccharides par chromatographie en phase liquide

Les analyses des oligosaccharides présents dans le surnageant de culture de la souche sont réalisées sur deux phases stationnaires distinctes : Rezex[®] et Aminopropyle.

8.1. Analyses sur colonne Rezex[™] RSO Oligosaccharides Ag⁺ (4%)

La colonne Rezex[™] RSO Oligosaccharides Ag⁺ (4%) (200 x 10 mm, Phenomenex, USA) permet la séparation d'oligosaccharides en fonction de leur degré de polymérisation (de DP 1 à DP 14). Elle est équipée d'une précolonne Rezex[™] 60 x 10 mm (Phenomenex, USA). Une fraction de surnageant de culture est centrifugée à 8000 rpm pendant 5 min à 4°C. 20 µL de surnageant sont

injectés. La température de la colonne est fixée à 85°C, et l'élution est réalisée à un débit fixe de 0,3 mL/min en mode isocratique par de l'eau ultrapure filtrée sur 0,22 µm. Les oligosaccharides sont élués dans l'ordre décroissant de leur DP, et sont détecté en sortie de colonne par un réfractomètre différentiel modèle RI detector 475 (Kontron Instruments, Suisse). L'acquisition des données est réalisée par une station informatique équipée du logiciel Millenium[®]32 (Waters, USA). Les analyses qualitative et quantitative sont réalisées par comparaison avec un chromatogramme étalon réalisé dans les mêmes conditions expérimentales avec des oses commerciaux (glucose, isomaltose et isomaltotriose, Sigma-Aldrich, USA).

8.2. Analyses sur colonne Aminopropyle

Afin de pouvoir différencier les isomères maltose et isomaltose présents dans le surnageant de culture, une analyse par chromatographie en phase normale a été réalisée. 5 µL de surnageant de culture sont injectés. La colonne Aminopropyle ULTRASEP ES 100 NH₂ 4µm (250 × 4,6 mm, Bischoff chromatography, Allemagne), est thermostatée à 35°C et les oses sont élués en mode isocratique à un débit de 1 mL/min par un mélange eau/acétonitrile 25:75 (v/v). La détection des oses en sortie de colonne est réalisée par un réfractomètre différentiel modèle RI detector 475 (Kontron Instruments, Suisse), et l'acquisition des données est réalisée par une station informatique équipée du logiciel Millenium[®]32 (Waters, USA). Les analyses qualitative et quantitative sont effectuées par comparaison avec un chromatogramme étalon obtenu dans les mêmes conditions expérimentales, avec du glucose, du maltose, de l'isomaltose, du maltotriose et de l'isomaltotriose comme références (Sigma-Aldrich, USA).

9. Détermination des activités glycohydrolasiques

1 mL d'une culture de *B. subtilis* CU1 est prélevé en fin de phase exponentielle de croissance puis centrifugé à 10000 rpm pendant 10 min à 4°C. L'activité glycohydrolasique extracellulaire est mesurée sur le surnageant.

Les culots bactériens sont lavés avec 2 mL de tampon Tris-HCl et repris dans 2 mL de tampon de lyse contenant 0,1% (v/v) de Triton X-100. Les cellules sont lysées mécaniquement par trois traitements de 20 s à 4°C à l'aide de billes de verre de 0,1 mm de diamètre et d'un ribolyseur (Ribolyser, Hybaid, Grande-Bretagne). Des périodes d'arrêt de 30 s à 4°C sont ménagées entre chaque

séquence de broyage afin d'éviter une dénaturation thermique. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation et les activités sont mesurées sur la fraction soluble.

Les activités glycohydrolasiques suivantes : α -D-galactosidase, β -D-galactosidase, α -D-glucosidase, β -D-glucosidases, ont été déterminées à 37°C, à pH 7 en mesurant le taux d'apparition de para-nitrophénol (pNP) libéré des oses para-nitrophényl.

Dans une micro-cuve de spectrophotométrie, 0,05 mL de substrat pNP (Sigma-Aldrich, USA) sont dilués dans 0,45 mL de tampon acétate de sodium 0,05 mM pH 4,5. Ensuite, 0,025 mL de surnageant ou de lysat bactérien sont additionnés au mélange. Après deux heures d'incubation à 30°C, la réaction est stoppée par addition de 0,5 mL de carbonate de sodium Na₂CO₃ 1M. La quantité de pNP libérée est déterminée par mesure de DO à 405 nm contre le blanc.

10. Dosage des acides gras à chaîne courte et de l'acide lactique

L'analyse de l'acide lactique et des acides gras à chaînes courtes est adaptée de Morales et coll. (1998), et a été réalisée sur les surnageants de culture de *B. subtilis* CU1 en présence de glucose ou d'IMOS comme unique source carbonée.

500 μ L de surnageant de culture prélevés après 8 h, 12 h, 24 h et 36 h de culture sont dilués avec de l'acide sulfurique 1 M jusqu'à une concentration finale en acide de 5 mM. 15 μ L d'acide 3-méthylvalérique, utilisé comme étalon interne à 10 mg/mL, sont additionnés au mélange. Après centrifugation 5 min à 10000 rpm, le surnageant est injecté sur une colonne Aminex HPX-87H (300 \times 7,8 mm, BioRad, USA) protégée par une pré-colonne Micro-Guard (BioRad, USA). L'élution des solutés est réalisée par de l'acide sulfurique 5 mM en mode isocratique à un débit fixe de 0,6 mL/min et une température réglée à 35°C. L'éluat est analysé en sortie de colonne par un spectrophotomètre (Waters 2489 UV/visible detector, USA) réglé à 215 nm. L'analyse qualitative est réalisée par comparaison des temps de rétention relatifs des composés inconnus avec ceux d'un mélange standard d'AGCCs (acide lactique, acide acétique, acide propionique, acide butyrique, acide iso-butyrique, acide valérique et acide iso-valérique) à une concentration de 1 mg/mL pour chaque étalon en solution dans H₂SO₄ 5 mM.

11. Test d'adhésion sur cellules Caco-2

Le test d'adhésion aux cellules épithéliales est mis en œuvre sur cellules Caco-2, un carcinome colorectal qui exprime des marqueurs caractéristiques des cellules épithéliales intestinales normales. De plus, la monocouche de cellules Caco-2 possède une structure similaire à l'épithélium intestinal. L'expérience est adaptée de Tallon et coll. (2007). Les cellules Caco-2 (ATCC HTB-37™) sont des cellules épithéliales intestinales humaines dérivées d'un adénocarcinome colorectal. Les cellules sont cultivées à 37°C sous atmosphère contrôlée à 5% en CO₂ et 95% d'humidité, en milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Eurobio, France) supplémenté par 10% (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF, IDbio, France), 2 mM de glutamine (Eurobio, France), 100 U/mL de pénicilline (Eurobio, France), 100 µg/mL de streptomycine (Eurobio, France) et 1 mM de pyruvate de sodium (Eurobio, France).

11.1. Préparation des cellules Caco-2

Les cellules Caco-2 sontensemencées en plaque 12 puits à raison de 10⁴ cellules par puit. Une fois les cellules confluentes, elles sont lavées avec trois fois avec du PBS stérile et repris dans 0,5 mL de DMEM dépourvu d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine).

11.2. Préparation des bactéries

Les bactéries sont cultivées en milieu minimum en présence de glucose ou d'IMOS comme cela a été décrit dans la section 5. 1 mL de culture est prélevé après 8 h, 12 h, 24 h et 36 h et centrifugé à 8000 rpm pendant 5 min. Le culot est lavé deux fois avec du PBS stérile et repris en milieu DMEM dépourvu d'antibiotiques. Chaque puit est inoculé à raison de 10⁵ UFC/mL et incubé 1 h à 37°C. Les cellules sont lavé dix fois avec du PBS afin de retirer toutes bactéries non-adhérées. 200 µL d'une solution de Triton X-100 à 0,5% (v/v) sont déposés dans les puits afin de désorber les bactéries adhérentes. Après une incubation de 1 h à température ambiante et sous agitation orbitale à 150 rpm, le contenu de chaque puit est centrifugé 5 min à 8000 rpm. Le culot est repris dans 1 mL de PBS et le nombre d'UFC dans la suspension est déterminé comme décrit dans la section 7.

La solution à 0,5% (v/v) de Triton X-100 nécessaire à la désorption des bactéries a au préalable été testée afin de vérifier que la concentration utilisée n'est pas létale pour les bactéries.

12. Analyse du protéome de *B. subtilis* CU1 par électrophorèse bidimensionnelle

L'analyse du protéome de *B. subtilis* CU1 a été réalisée en collaboration avec la plateforme de protéomique du Service Commun de Recherche et d'Analyse de Biomolécules de Limoges (SCRABL).

12.1. Extraction des protéines totales

La méthode d'extraction des protéines est adaptée de Li et coll. (2012). Une culture (20 mL) en fin de phase exponentielle de *B. subtilis* CU1 (12 h pour le substrat glucose, 14 h pour le substrat IMOS), réalisée en milieu minimum avec le glucose ou les IMOS comme unique substrat carboné, est centrifugée à 3500 rpm pendant 20 min à 4°C. Le culot est lavé trois fois avec 5 mL de tampon Tris-HCl / pH 7,4 puis repris dans 1,5 mL de tampon de lyse Tris-HCl 0,05 M à pH 8 contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete™ Protease Inhibitor Cocktail Tablet, EDTA-Free, Roche, Suisse). La suspension est soumise à une lyse par ultrasons à 4°C pendant 10 min (pulse 10 s - pause 50 s) à une puissance de 15 W afin de briser les parois bactériennes, puis est lyophilisée (lyophilisateur Labconco Freezone 2.5, VWR, USA). Le lyophilisat est repris dans 0,5 mL de tampon de solubilisation composé d'urée 8 M, de thiourée 2 M, de CHAPS 4% et de DTT 65 mM. Le mélange est placé 1 h à 4°C puis agité au vortex 30 s. Il est ensuite placé à température ambiante pendant 1 h et agité vigoureusement afin de solubiliser les protéines associées à la paroi. Après une centrifugation de 30 min/10000 rpm/4°C visant à éliminer le matériel insoluble, le surnageant est conservé à -20°C jusqu'à la précipitation des protéines.

L'extraction est réalisée sur quatre cultures bactériennes indépendantes (réplicats biologiques) pour chaque condition de culture testée.

12.2. Précipitation des protéines

La précipitation est réalisée en duplicat pour chacun des extraits. La précipitation des protéines est mise en œuvre avec le kit 2D-Clean Up (GE Healthcare, Suède) selon les recommandations du fabricant. Les tubes sont placés dans un bain à ultrasons pendant 5 min dans de la glace puis centrifugés à 12000 rpm pendant 5 min à 4°C avant utilisation. Les extraits protéiques sont solubilisés dans un tampon composé d'urée 8 M, de thiourée 2 M, et de CHAPS 4%, et conservés à -20°C.

12.3. Dosage des protéines

Le dosage des protéines est réalisé en triplicat à l'aide du kit 2D-Quant (GE Healthcare, Suède) selon la procédure standard recommandée par le fabricant.

La qualité des extraits est ensuite contrôlée sur un gel SDS-PAGE : 20 µg de protéines dénaturées à l'aide d'un Tampon de charge 5X (10% SDS (p/v), 50% glycérol (v/v), 300 mM Tris pH 6,8, 0,5 M DTT) sont déposés sur un gel 10% SDS-PAGE (10 × 10.5cm) à l'aide du système VE 260 Hoefer (Amersham Biosciences, GE Healthcare, Suède). La migration est réalisée dans un tampon de migration (192 mM glycine, 25 mM Tris, 0,1% SDS (v/v)) à 4°C pendant 1 h 30 à ampérage constant (20 µA/gel). Le gel est ensuite coloré au bleu colloïdal (cf. section 12.6).

12.4. Première dimension : isoélectrofocalisation

12.4.1. Réhydratation des bandes d'IPG

L'étape de focalisation isoélectrique des protéines est réalisée sur des bandes d'IPG (Immobilized pH gradient) de 7 cm avec un gradient de pH linéaire allant de 4 à 7 (Immobiline™ DryStrip pH 4-7, 7 cm, GE Healthcare, Suède). Les bandes sont réhydratées dans un Reswelling Tray (GE Healthcare, Suède) pendant 12 h à température ambiante avec 125 µL de tampon de réhydratation dont la composition est présentée dans le tableau Tableau 11 :

Constituants	Concentration finale
Urée	8 M
Thiourée	2 M
CHAPS	4% (p/v)
DTT	65 mM
IPG Buffer (Amersham Biosciences, GE Healthcare, Suède)	0,5% (v/v)
Bleu de bromophénol	traces
H ₂ O mq	q. s. p.

Tableau 11: Composition du tampon de réhydratation des bandes d'IPG

12.4.2. IEF

Du DTT et de l'IPG Buffer sont additionnés aux extraits protéiques jusqu'à des concentrations finales respectives de 65 mM et 0,5% (v/v) (concentrations dans la solution de réhydratation). Les échantillons (125 µg de protéines /gel) sont déposés sur les bandes dans les cupules de dépôt (Cup loading, GE Healthcare, Suède) placées du côté anode. L'IEF est réalisée à 20°C sur un système IPGphor (GE Healthcare, Suède). Un gradient de voltage est appliqué à chaque bande d'IPG selon les étapes décrites Figure 13, avec une intensité maximale de 50 µA par bande.

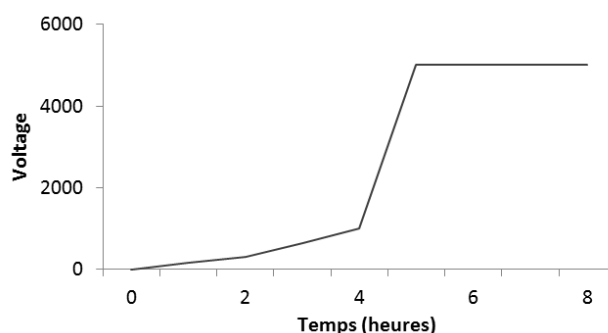


Figure 13: Gradient de voltage au cours de l'étape d'IEF

Après la focalisation des protéines, les bandes d'IPG sont incubées 15 minutes dans une solution de réduction (Tris pH 8,8, SDS 2%, urée 6 M, glycérol 30%, et DTT 125 mM), suivi par 15 minutes dans une solution d'alkylation (Tris pH 8,8, SDS 2%, urée 6 M, glycérol 30%, iodoacétamide 125 mM, et des traces de bleu de Bromophénol).

12.5. Deuxième dimension : SDS-PAGE

Les gels de première dimension sont déposés sur un gel d'électrophorèse de polyacrylamide 10% dont la composition est détaillée dans le Tableau 12 (100 × 105 mm, épaisseur 1,5 mm). De l'agarose 1% (p/v) est coulé entre les deux plaques du gel de seconde dimension permettant de maintenir les deux gels en contact.

Constituants du gel SDS-PAGE 1.5mm	Concentration
Acrylamide 40% (GE Healthcare, Suède)	10 % (p/v)
Bisacrylamide 2% (GE Healthcare, Suède)	2,7 % (p/v)
Tris 1.5 M pH 8,8	0.386 M
SDS 20%	0,1 % (p/v)
APS 10%	0,05 % (p/v)
Temed	0,1 % (v/v)
H ₂ O	Q.S.P.

Tableau 12: Composition du gel de polyacrylamide

L'électrophorèse est réalisée sur un système de séparation vertical Mini VE 260 Hoefer (GE Healthcare, Suède) équipé d'un générateur de type Electrophoresis Power Supply 1001 (GE Healthcare, Suède).

La migration est réalisée dans un tampon de migration (glycine 192 mM, Tris 25 mM, et 0.1% SDS (v/v)) à 4°C pendant 2h30 à un voltage constant de 100 V (Laemmli 1970).

12.6. Coloration des gels au bleu colloïdal (G-250)

La révélation des protéines au bleu colloïdal nécessite quatre étapes successives. Les protéines sont tout d'abord fixées dans le gel en l'immergeant pendant 2 h minimum dans une solution d'éthanol à 30% (v/v) contenant 2% (v/v) d'acide orthophosphorique. Le gel est ensuite immergé dans deux bains successifs de 30 min d'acide orthophosphorique 2% (v/v). La coloration est réalisée dans une solution de sulfate d'ammonium 1,2 mM contenant 18% (v/v) d'éthanol et 2% (v/v) d'acide orthophosphorique. Après 30 min, 1% (v/v) d'une solution de bleu colloïdal G-250 (Merck, Allemagne) à 0,5% (p/v) est additionnée à la solution de coloration. Le gel est coloré pendant 72 h sous agitation planétaire, à température ambiante. Les gels sont ensuite stockés dans une solution d'acide acétique 3% à 4°C.

12.7. Analyse des gels

Les gels sont scannés avec un Scanner II (Amersham Biosciences, GE Healthcare, Suède) couplé au logiciel Labscan du même fabricant. L'analyse d'image qualitative et quantitative est réalisée avec le logiciel Samespot. Les images 2D obtenus avec les extraits protéiques de la condition IMOS sont comparées à celles obtenues pour la condition témoin glucose. Leur intensité est normalisée en la rapportant à l'ensemble des intensités des spots valides afin de s'affranchir de la variabilité expérimentale. Dans le cadre de la comparaison des niveaux d'expression des protéines d'une même souche consécutivement à une modification des conditions de culture, une protéine est considérée comme sur- ou sous-exprimées quand l'intensité du spot varie d'au moins 1,3 fois entre les gels. La significativité du niveau d'expression est calculée par un *t* test de Student.

12.8. Analyse des spots protéiques par spectrométrie de masse en mode ESI-MS

Pour l'étude protéomique des protéines séparées sur gels bidimensionnels, un protocole de digestion "*in-gel*" de chaque spot protéique a été utilisé.

12.8.1. Etape de lavage des échantillons

Une fois séparés par électrophorèse 2D, les spots protéiques d'intérêt sont excisés manuellement du gel et placés dans des tubes Eppendorf. Les spots sont décolorés par lavages à l'eau milliQ, puis déshydratés dans 50 μ L d'acétonitrile suivi par une réhydratation dans 50 μ L d'hydrogénocarbonate d'ammonium 100 mM pendant 15 min à 37°C. Un volume équivalent d'acétonitrile est ensuite ajouté au mélange, suivi d'une incubation à 37°C pendant 15 min. Les spots sont ensuite séchés sous vide à l'évaporateur centrifuge (Speed Vac, Thermo Scientific, USA).

12.8.2. Digestion des protéines

Les protéines sont digérées "*in-gel*" pendant une nuit à 37°C dans 25 μ L d'une solution de trypsine (Promega, USA) à 10 ng/mL dans du tampon hydrogénocarbonate de sodium 25mM, pH 8.

12.8.3. Extraction des peptides trypsiques

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 surnageants sont collectés dans un tube à centrifuger de 0,5 mL. Les peptides trypsiques sont extraits pendant 15 min à température ambiante successivement par 50 µL d'une solution acétonitrile/acide formique/eau 40:1:59 (v/v/v), puis par 10 µL d'une solution acétonitrile/acide formique/eau 25:1:74 (v/v/v), et enfin par 25 µL d'une solution acétonitrile 60%. Les peptides extraits sont ensuite séchés sous vide à l'évaporateur centrifuge.

12.8.4. Analyse nano-LC QTRAP

Après la digestion trypsique, les peptides sont resolubilisés dans 10 µl d'ACN 2% (v/v) contenant 0,05% (v/v) d'acide trifluoroacétique pour l'analyse par nano-LC MS/MS. Ce système est composé d'une nano-LC Ultimate 3000 (Dionex ThermoScientific, Amsterdam, Pays-Bas) couplé hors-ligne à un spectromètre de masse QTRAP (ABSciex, USA). Pour chaque échantillon, 5 µl sont injectés dans une pré-colonne (C18 Pepmap™ 300 µm ID × 5 mm, Dionex, USA) et élués à un débit de 30 µl/min par une solution aqueuse contenant 2% (v/v) d'ACN et 0,05% (v/v) de TFA (Solvant A). Après une étape de dessalage de 3 min, la pré-colonne est couplée à la colonne analytique (C18 Pepmap™ 75 µm ID × 150 mm, Dionex, USA) équilibrée préalablement avec 100% de solvant A (ACN 2% (v/v), acide formique 0,1% (v/v)). Les peptides sont élués de la pré-colonne vers la colonne analytique grâce à un gradient linéaire de 0% à 50% de solvant B (ACN 90% (v/v), TFA 0,1% (v/v)) pendant 65 min à un débit de 300 nl/min. L'acquisition des données est réalisée selon la méthode IDA (Information-Dependant Acquisition) du logiciel Analyst 1.4.2 (ABSciex, USA). Les données de MS et MS/MS sont enregistrées de façon continue avec une durée de cycle de 3 secondes. Pour chaque scan MS, deux précurseurs sont sélectionnés pour la fragmentation, sur la base de leur intensité (supérieure à 20 000 cps), de leur état de charge (2+, 3+), et si ce précurseur a déjà été sélectionné précédemment pour la fragmentation (exclusion dynamique). Les énergies de collision sont ajustées automatiquement en fonction de l'état de charge et de la masse des ions précurseurs sélectionnés.

12.8.5. Recherche dans les bases de données

Pour l'identification des protéines, les résultats de l'analyse par nano-LC MS/MS sont analysés par le logiciel Protein Pilot (version 4.5) pour interroger les banques de données UniProt/*Bacillus subtilis* (release 2014_09, téléchargée à partir du site Uniprot) via le logiciel Mascot (version 2.2,

Matrix Science, Angleterre) en prenant en compte les critères suivants : 0,5 Da de tolérance pour la masse des peptides et 0,5 Da pour des fragments peptidiques, un seul site de clivage manquée lors de la digestion trypsique, et la carbamidométhylation des résidus cystéine (due à l'alkylation des groupements –SH par l'iodoacétamide) et l'oxydation de la méthionine comme modifications variables. L'identification des protéines est validée pour un score supérieur à 50 avec un peptide ayant un score supérieur à 50 ou plusieurs peptides avec des scores supérieurs à 25 avec un taux de confiance au moins égal à 95%.

2

Etude de la relation structure-activité des acides lipotéichoïques de trois souches probiotiques du genre *Bacillus*

1. Souches bactériennes

Les souches probiotiques utilisées au cours de nos travaux sont *Bacillus cereus* CH, *Bacillus subtilis* CU1, et *Bacillus clausii* O/C. L'origine des souches est présentée dans le tableau suivant :

Souche bactérienne	Distributeur
<i>Bacillus cereus</i> CH	Anyang Yuanshou Biopharmaceutical / Chine
<i>Bacillus subtilis</i> CU1	Lesaffre / France
<i>Bacillus clausii</i> O/C	Sanofi Aventis / France

Tableau 13: Liste des souches commerciales étudiées et leurs origines.

Les souches sont conservées à -80°C sur des microbilles en présence de glycérol à 18% (v/v).

2. Conditions de culture

Les souches de *Bacillus* sont cultivées dans un milieu MH (Mueller-Hinton, Biokar Diagnostics/ Solabia, France) constitué de 17,5 g/L d'hydrolysate acide de caséine, 2 g/L d'infusion de viande et 1,5 g/L d'amidon soluble.

Avant utilisation, les milieux de culture sont autoclavés pendant 15 min à 121°C. Ils sont utilisés sous forme de bouillons ou de milieux gélosés par addition d'agar à 15 g/L.

L'établissement des courbes de croissance a été réalisé comme cela a été décrit dans la section 6.1 de la partie 1 du Matériel et méthodes.

3. Extraction et purification des acides lipotéichoïques (LTAs)

3.1. Extraction des LTAs au *n*-butanol et hydrolyse des esters de D-alanine

L'extraction des LTAs de chaque souche probiotique est adaptée de la méthode décrite par Morath et coll. (2001). Cette méthode s'effectue en présence d'un solvant organique, le *n*-butanol à température ambiante.

Une culture pure de 6,4 L, en fin de phase exponentielle, est centrifugée à 3500 rpm pendant 15 min à 4°C. Le culot est lavé trois fois avec du tampon Tris-HCL 0,1 M/pH 8 (Eurobio, France) puis repris dans 20 mL de tampon acétate d'ammonium 0,1 M/pH 4,7. 20 mL de *n*-butanol (Fisher Scientific, Royaume-Uni) sont ajoutés au mélange qui est ensuite agité à 300 rpm pendant 30 min à 37°C. Après centrifugation à 12000 rpm pendant 15 min à 4°C, la phase aqueuse contenant les LTAs est récupérée. Le culot est remis en suspension dans 20 mL de tampon acétate d'ammonium 0,1M/pH 4,7 puis soumis aux ultrasons deux fois consécutives à une puissance de 80 W pendant 2 min à 4°C par impulsions de 10 s, suivies de phases de repos de 15 s (sonde de 30 mm, Sonicateur Vibracell VC 750 Ultrasonic Processor, Hielscher, Allemagne). 20 mL de *n*-butanol sont ajoutés au lysat bactérien, suivi d'une agitation à 300 rpm pendant 30 min à température ambiante. La phase aqueuse est récupérée après centrifugation à 12000 rpm pendant 15 min à 4°C. Les phases aqueuses sont rassemblées puis lyophilisées (lyophilisateur Labconco Freezone 2.5, VWR, USA).

Afin d'hydrolyser spécifiquement les esters de D-alanine, une fraction de chaque solution de LTAs extraits des différences souches de *Bacillus* a été ajustée à pH 8,5 avec de l'ammoniac et incubée une nuit à 37°C, comme décrit par Morath et coll. (2001). La déalanylation des LTAs a été contrôlée par RMN ¹H (section 5).

3.2. Purification des LTAs par chromatographie

La purification des LTAs est réalisée selon une séquence chromatographique en deux étapes décrite par Ryu et coll. (2009). La première étape de chromatographie d'interactions hydrophobes permet de séparer les LTAs sur le critère de leur hydrophobie, liée à leur partie lipidique. Les LTAs sont ainsi séparés des acides nucléiques, contaminants majeurs des extraits. Une seconde étape de chromatographie d'échange d'ions permet de séparer les LTAs (composés polyanioniques) des éventuels contaminants non ionisés, sur le critère de la charge nette.

Le système chromatographique est composé d'un chromatographe LC-20AD (Shimadzu, Japon) couplé à une unité de dégazage DGU-20A5R (Shimadzu, Japon). La colonne est placée dans un four CTO-10ASvp (Shimadzu, Japon) et est reliée à un détecteur à barette de diode SPDM20A (Shimadzu, Japon).

3.2.1. Chromatographie d'interactions hydrophobes

Les extraits lyophilisés sont repris dans 15mL de tampon acétate d'ammonium 0,1 M/pH 4,7 contenant 15% (v/v) de 1-propanol. Après centrifugation (12000 rpm, 15 min, 4°C), le surnageant est appliqué sur une colonne Octyl Sepharose HiPrep™ (100 x 16 mm, GE Healthcare, Suède) à un débit fixe de 2 mL/min. La phase stationnaire est ensuite lavée par un tampon acétate d'ammonium 0,1 M/pH 4,7 contenant 15% (v/v) de 1-propanol. Les LTAs sont ensuite élués sélectivement par 68 mL de tampon acétate d'ammonium 0,1 M/pH 4,7 ajusté à 35% (v/v) en 1-propanol. Le suivi de l'éluat est réalisé par mesure en continu de l'absorbance de l'éluat à 220 nm. Des fractions de 4 mL sont collectées et analysées sur la base de leur concentration en phosphore.

3.2.2. Chromatographie d'échange d'ions

Les fractions les plus concentrées en phosphore, témoignant de la présence de LTAs, repris à l'issue de l'étape de chromatographie d'interactions hydrophobes, sont rassemblées et ajustées par dilution à une concentration finale de 20 mM en acétate d'ammonium (pH 4,7) et par addition de 1-propanol à 30% (v/v) (Tampon A). La solution est déposée sur une phase stationnaire échangeuse d'anions de type DiEthyl Amino Ethyl (DEAE-Sepharose, Fast Flow, GE Healthcare, Suède) conditionnée dans une colonne AP-1 (100 x 10 mm, Waters, USA). La phase stationnaire est éluée à un débit fixé à 2 mL/min par le Tampon A. Les LTAs sont élués sélectivement par un gradient linéaire de NaCl (0 à 1 M) dans le tampon A. L'éluat est collecté par fractions de 4 mL, qui sont ensuite analysées sur la base de leur contenu en phosphore.

3.3. Contrôle de la stabilité chimique des LTAs par CCM

La stabilité de la liaison ester entre la D-alanine et le carbone 2 du glycérol a été contrôlée par chromatographie sur couche mince. Cette dernière est mise en œuvre sur plaque de verre recouverte de cellulose microcristaline (Merck, Allemagne) à partir des échantillons de LTAs purifiés, et la migration des composés est réalisée par un mélange butanol/acide acétique/eau 3:3:1 (v/v/v). Une solution de ninhydrine à 1% (p/v) dans l'acétone suivi d'une incubation à 110°C pendant 15 min permet la révélation des fonctions amines libres de l'alanine présente dans l'échantillon.

4. Caractérisation chimique des LTAs

4.1. Dosage du phosphore

Le dosage du phosphore est adapté de la méthode de Chen et coll. (1956). Cette méthode est basée sur la minéralisation du phosphore organique en orthophosphate, suivi de la conversion des ions phosphates par le molybdate d'ammonium en phosphomolybdate d'ammonium. Ce dernier est réduit par l'acide ascorbique en bleu de molybdène qui absorbe à 820 nm.

Le protocole mis en place est utilisé pour la détection du phosphore dans les différentes fractions chromatographiques et pour la caractérisation biochimique des différents LTAs purifiés.

0,01 mL de chaque fraction d'éluat sont minéralisés en tubes à hémolyse, à la flamme d'un bec Bunsen, en présence de 0,03 mL de nitrate de magnésium à 10 % (p/v) dans l'éthanol absolu. Le résidu sec est repris par 0,3 mL d'HCl 0.5 M puis placé 15 min au bain-marie à 100°C. Après refroidissement, 0,7 mL d'un mélange 6:1 (v/v) de molybdate d'ammonium 0.42% (p/v) dans H₂SO₄ 0,5 M et d'acide ascorbique 10% (p/v) 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 l'absorbance à 820 nm en équivalent phosphore est réalisée à l'aide d'une droite étalon établie à partir d'une solution de Na₂HPO₄ 10 mM contenant de 0 à 0.9 µg de phosphore.

4.2. Détermination de la composition en oses et glycérol

L'analyse de la composition en oses et glycérol des LTAs est réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Après hydrolyse acide des LTAs, les oses et résidus glycérol sont dérivés par du trimethylsilylimidazole (TMSIM, Grace Davison Discovery

Sciences, USA). Cette méthode permet l'obtention de dérivés triméthylsilylés, composés volatils et stables facilement analysables par CPG. Le principe de la réaction de silylation est le suivant :

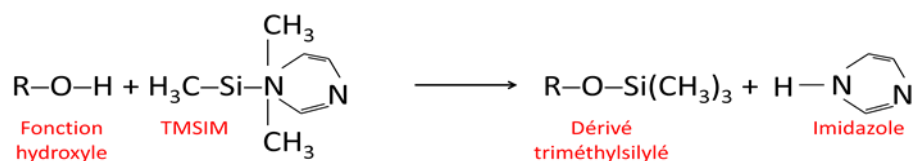


Figure 14: Réaction de dérivation des fonctions hydroxyles par le TMSIM

4.2.1. Hydrolyse par l'acide trifluoroacétique

Une quantité d'échantillon contenant 13 à 20 µg d'équivalent glucose (estimation basée sur le dosage des oses par la méthode de Dubois et coll. (1951)) est placée dans un tube en verre à dérivation, à fond conique (32 × 11,6 mm ; ICS, France) en présence de 10 µL d'une solution de MyoInositol à 10 mg/mL utilisé comme étalon interne. Après séchage sous vide, 200 µL d'acide trifluoroacétique (TFA) 4 M sont additionnés à chaque échantillon. Les tubes sont fermés hermétiquement puis placés en étuve à 125°C pendant 1 h.

4.2.2. Dérivation au TMSIM

Les hydrolysats acides sont séchés sous courant d'azote puis incubés en présence de 15 µL de TMSIM et de 15 µL de pyridine (Sigma-Aldrich, USA). Après agitation suivie de 30 min d'incubation à température ambiante, 5 µL de mélange sont dilués dans 95 µL d'hexane et centrifugés à 10000 rpm pendant 3 min à température ambiante. 1 µL de la phase hexane est injecté dans le système chromatographique.

4.2.3. Analyse chromatographique des oses et du glycérol

L'analyse chromatographique est réalisée à l'aide d'un système chromatographique en phase gazeuse couplé à une détection par spectrométrie de masse (modèle QP2010 series, Shimadzu, Japon) fonctionnant en mode impact électronique. La colonne utilisée est de type PTE (diméthylsilicone greffé à 5% par des groupements phenyl, 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 µm. L'injection est réalisée en mode splitless, la température de l'injecteur est fixée à 250°C et le débit du

gaz vecteur (hélium) est réglé à 2 mL/min. L'élution des composés est réalisée en mode gradient de température selon le programme suivant :

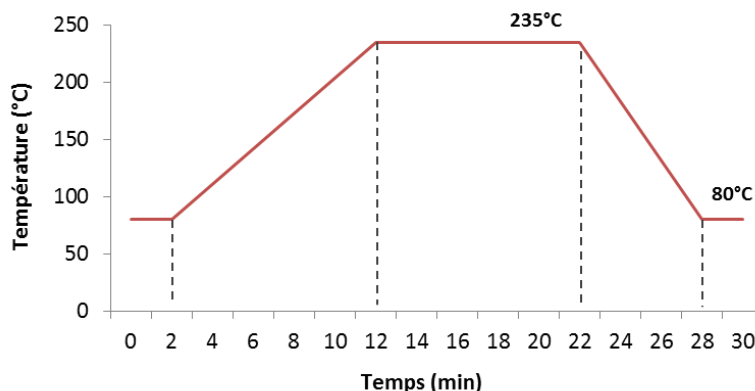


Figure 15: Gradient de température utilisé pour l'analyse des dérivés triméthylsilylés par CPG/SM.

- Analyse qualitative

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

- Son temps de rétention relatif T_r 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 banque de spectres de références du logiciel Masslab (LIBTX et NIST, 300000 références).

Le temps de rétention relatif T_r est calculé d'après la relation suivante :

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

Avec $T_{R.inc}$ le temps de rétention absolu du composé inconnu et $T_{R.ét.int}$ le temps de rétention absolu de l'étalon interne.

- 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'élué de l'ose identifié, est pris en considération :

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

Avec :

$C_{ét}$ = concentration de l'ose étalon dans le mélange témoin ;

$A_{ét}$ = 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 (élué au même T_r que l'ose étalon du mélange témoin) ;

$C_{ét.int}$ = concentration de l'étalon interne dans le mélange témoin ;

$A_{ét.int}$ = aire de l'étalon interne dans le mélange témoin ;

$C'_{ét.int}$ = concentration de l'étalon interne dans l'échantillon inconnu ;

$A'_{ét.int}$ = aire de l'étalon interne dans l'échantillon inconnu,

d = facteur de dilution, de l'échantillon après dérivation.

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

4.3. Analyse de la composition en acides gras

La composition en acides gras des LTAs est déterminée par GC-MS après méthanolyse, d'après la méthode décrite par Lepage et coll. (1986).

4.3.1. Préparation des esters méthyliques d'acides gras par méthanolyse

80 à 100 μg de LTAs, en équivalent phosphore, sont placés dans des ampoules autocassables de 2 mL (Merk, Allemagne). 10 μL d'une solution d'acide margarique (acide heptadécanoïque) utilisé comme étalon interne à 10 mg/mL sont additionnés à chaque échantillon avant méthanolyse. Le mélange est séché sous vide. Les résidus secs sont repris dans un mélange de dérivation Méthanol/Benzène/Chlorure d'acétyle 4:1:0,5 (v/v/v, Grace Alltech, France). Les ampoules sont scellées hermétiquement et placés à 100°C pendant 1 h. Après refroidissement, la totalité du mélange

est récupérée dans des tubes à hémolyse, préalablement dégraissés par un lavage à l'aide d'un mélange chloroforme/méthanol 2:1 (v/v). Ensuite, 2,5 mL d'une solution de K₂CO₃ 6% (p/v) sont additionnés dans chaque tube suivi d'une centrifugation pendant 5 min à 2000 rpm à température ambiante. 1 µL de la phase benzène, contenant les acides gras, est injecté sur le système chromatographique.

4.3.2. Analyse des esters méthyliques d'acides gras

L'analyse est réalisée en utilisant le système chromatographique en phase gazeuse décrit précédemment pour l'analyse des oses et du glycérol. La colonne capillaire utilisée est de type INNOWAX (J&W Scientific, USA), d'une longueur de 30 m et d'un diamètre intérieur de 0,25 mm. La phase stationnaire est constituée d'un film de polyéthylèneglycol (PEG, polaire) de 0,15 µm d'épaisseur. L'injection est réalisée à 250°C en mode split avec un rapport de division de 20. L'élution des composés est réalisée par de l'hélium en mode isotherme à 180°C à un débit de 2 mL/min. Les analyses qualitative et quantitative de la composition des LTAs en acides gras sont réalisées sur des principes identiques à ceux décrits précédemment pour l'analyse des oses et du glycérol.

4.4. Analyse de la composition en acides aminés

L'alanine de la série D (D-alanine), seul acide aminé présent dans la structure des LTAs, est analysée par la méthode Pico Tag (Waters, USA) adaptée de Bidlingmeyer et coll. (1984). Après hydrolyse acide, les acides aminés sont dérivés par du phenylisothiocyanate (PITC) permettant l'obtention d'acides aminés phenylthiocarbamyl (PTC-AA) détectables par spectrophotométrie UV à 254 nm :

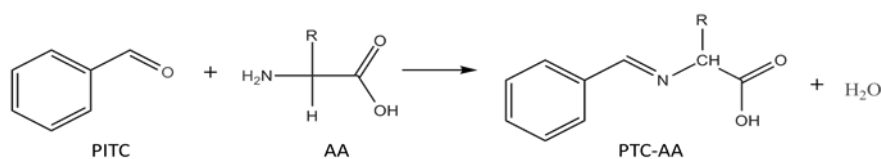


Figure 16: Réaction de dérivation des fonctions amines par le PITC.

Les PTC-AA sont analysés par chromatographie liquide haute performance (HPLC, système Kontron Instruments, Allemagne) en phase inverse, équipée 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) et d'un détecteur UV (modèle Water 486).

4.4.1. Préparation des échantillons

Les fractions purifiées contenant les LTAs à analyser sont dialysées contre 5 L de tampon acétate de sodium 5 mM/pH 4.7 à 4°C pendant 24 h. Une quantité de LTAs dialysés de 200 nmol équivalent phosphate est placée dans des tubes à dérivation (Jiffylite, Sealed air, USA) préalablement pyrolysés 5 h à 400°C. 25 nmol d' α -aminobutyrate utilisé comme étalon interne sont ajoutés dans les tubes à dérivation avant séchage sous vide. Les résidus secs sont soumis à une hydrolyse acide par HCl 5.6 M, en phase vapeur à 110°C pendant 24 h sous vide en présence de cristaux de phénol. Chaque hydrolysate est séché sous vide puis neutralisé par addition de 10 μ L d'un mélange éthanol/eau/triéthylamine 2:2:1 (v/v/v). Après une nouvelle évaporation sous vide, 20 μ L d'un mélange de dérivation éthanol/eau/triéthylamine/PITC dans les proportions 7:1:1:1 (v/v/v/v) sont ajoutés dans chaque tube. L'incubation est effectuée à température ambiante durant 15 min.

4.4.2. Analyse des PTC-AA par HPLC en phase inverse

Après dérivation, les échantillons sont séchés sous vide afin d'éliminer le réactif, puis repris par 200 μ L de tampon échantillon (95% (v/v) de tampon hydrogénophosphate de sodium à 0,071% (p/v) à pH 7.4 ; 5% (v/v) d'acétonitrile). Après centrifugation à 4000 rpm/4°C/10 min, 20 μ L de surnageant sont déposés sur une colonne C18 (3.9 \times 150 mm) Waters AccQ.Tag™ (Waters, USA) de granulométrie de 4 μ m. L'élution des PTC-AA est réalisée à un débit de 1 mL/min à 44°C en mode gradient de phase mobile, la détection s'effectue par spectrophotométrie UV à 254 nm. Les compositions des différents constituants de la phase mobile sont indiquées ci-dessous :

Tampon A	Tampon B
470 mL d'une solution contenant :	- 300 mL acétonitrile
5.7 g d'acétate de sodium anhydre	- 200 mL H ₂ O
0.25 mL de Triéthylamine	- 100 μ L EDTA à 1 mg/mL
100 μ L d'EDTA à 1 mg/mL	
QSP 500 mL d'H ₂ O	
pH 6.4	
30 mL acétonitrile	

Tableau 14: Composition des tampons d'élution utilisés pour l'analyse de la composition en acides aminés.

Le gradient d'élution utilisé pour la séparation des PTC-AA est le suivant :

Temps (min)	%A	%B
0	100	0
11	54	46
11.2	0	100
13	0	100
13.5	100	0
29	100	0

Tableau 15: Gradient d'élution utilisé pour l'analyse HPLC des PTC-AA.

L'analyse qualitative et quantitative des acides aminés repose sur les mêmes principes que ceux décrits précédemment pour l'analyse des oses.

5. Caractérisation structurale des LTAs par RMN ¹H

L'ensemble des analyses RMN ¹H a été réalisé en collaboration avec la plateforme INRA UR1268 IBiSA BIBS « BIopolymères, Biologie Structurale » de Nantes.

5.1. RMN ¹H

Les analyses de RMN ¹H sont réalisées avec un spectromètre Bruker AVANCE 400 III (USA) fonctionnant à une fréquence de 400,13 MHz, et avec une sonde double résonance ¹H / X BBF0 5 mm. L'acquisition utilisée est une séquence d'impulsions à 90° avec pré-saturation de l'eau et un temps de recyclage de 10 s. Les spectres, obtenus avec une accumulation moyenne de 2048 balayages, sont référencés en utilisant le signal de l'(acide 3-trimethylsilyl)3,3,2,2-tetra-deutéropropionique (d₄-TSPA, Sigma-Aldrich, USA) à 0 ppm. Les signaux du FID sont retraités par le logiciel Topspin 2.1[®]. Un élargissement linéaire à 0,3 Hz est appliqué. Le logiciel Peakfit[®] est utilisé pour la déconvolution spectrale, afin de déterminer les déplacements chimiques, les constantes de couplage et les aires de pic.

5.2. Elucidation de la structure des LTAs

En utilisant les déplacements chimiques assignés par Morath et coll. (2001) et Jang et coll. (2011), les données utilisées au cours de cette étude sont décrites dans le Tableau 16.

La longueur moyenne de la chaîne de glycérol-phosphate ainsi que le degré de substitution par des résidus de D-alanine et de *N*-acétylglucosamine sont quantifiés à partir des résultats obtenus avec le logiciel de déconvolution Peakfit®. La quantité totale de résidus de glycérol est déterminée à partir de l'aire de la région entre 3,8 et 4,2 ppm. Le ratio de l'aire du glycérol et du groupement α -méthylène de l'ancre lipidique entre 2,2 et 2,5 ppm permet de déterminer le DP moyen de la chaîne de glycérol-phosphate. Le ratio entre l'aire de la D-alanine liée et la quantité totale de glycérol permet d'obtenir la proportion de glycérol substitué par la D-alanine. Le ratio entre l'aire de l' α -D-*N*-acétylglucosamine H₄ ($\delta = 3,49$ ppm) et la quantité totale de glycérol permet de déterminer la proportion de glycérol substitué par l' α -D-*N*-acétylglucosamine H₄. Le pic à 2,1 ppm assigné aux groupements *N*-acétyl dans la littérature n'est pas utilisé pour les calculs étant donné la présence de pics superposés au niveau de ce déplacement chimique.

		δ (ppm)	3J (Hz)
<i>Acides gras</i>	$-CH_2$ (α)	2.35	
	$-CH_2$ (γ ω)	1.30	
	$-CH_3$	0.88	
<i>D-alanine</i>	H_α libre	3.79	7.2
	H_β libre	1.48	7.2
	H_α liée	4.30	7.2
	H_β liée	1.64	7.2
<i>Glycérol</i>	<i>Quantité totale</i>	[3.8 - 4.2]	
α -D- <i>N</i> -acétyl-glucosamine	<i>GN-H₄</i>	3.49	9.5
	<i>GN-Ac</i>	2.10	

Tableau 16: Déplacements chimiques et constantes de couplages utilisés pour l'élucidation de la structure des LTAs par RMN ¹H.

6. Détermination de l'activité biologique des LTAs

6.1. Modèles cellulaires utilisés

Les propriétés biologiques des LTAs sont analysées sur trois modèles cellulaires : une lignée cellulaire de cancer colorectal humain (Caco-2), les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) et une lignée de macrophages murins (RAW 264.7).

Les cellules Caco-2 (ATCC HTB-37™) sont des cellules épithéliales intestinales humaines dérivées d'un adénocarcinome colorectal. Les cellules sont cultivées en milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Eurobio, France) supplémenté par 10% (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF, IDbio, France), 2 mM de glutamine (Eurobio, France), 100 U/mL de pénicilline (Eurobio, France), 100 µg/mL de streptomycine (Eurobio, France) et 1 mM de pyruvate de sodium (Eurobio, France).

Les cellules mononuclées du sang périphérique humain (PBMCs) sont des cellules sanguines avec un noyau de forme arrondie, comprenant notamment les monocytes et les lymphocytes. Les PBMCs sont récupérées à partir du sang total de donneurs. Elles sont cultivées en milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute, Eurobio, France), supplémenté par 10% (v/v) de SVF (IDbio, France), 2 mM de glutamine (Eurobio, France), 1 mM de pyruvate de sodium (Eurobio, France), 1% (v/v) d'acides aminés non-essentiels (Eurobio, France), 1% (v/v) de vitamines (Eurobio, France), 100 U/mL de pénicilline (Eurobio, France) et 100 µg/mL de streptomycine (Eurobio, France).

Les cellules RAW 264.7 (ATCC TIB-71™) sont des cellules de macrophages murins dérivées d'une tumeur induite par le virus d'Abelson (Ab-MLV), utilisé pour immortaliser les cellules lymphoïdes murines. Les cellules RAW 264.7 sont cultivées en milieu RPMI dont la composition est identique à celle décrite précédemment pour les PBMCs.

Les cellules sont cultivées dans une atmosphère contrôlée à 37°C, 5% de CO₂ et 95% d'humidité.

6.2. Détermination de l'induction de gènes chez des cellules Caco-2 par RT-qPCR

L'étude de l'induction de gènes chez des cellules épithéliales intestinales Caco-2 est basée sur les observations réalisées par Bahrami et coll. (2011).

6.2.1. Stimulation des cellules Caco-2

Les cellules Caco-2 sont ensemencées en plaques six puits (Nunc™, ThermoScientific, USA). Après atteinte de la confluence estimée à 90%, les cellules sont incubées avec les LTAs purifiés, aux concentrations 1 et 10 µg/mL, pendant 4 h à 37°C. L'acétate de sodium 5 mM/pH 4,7 est le solvant dans lequel sont dilués les LTAs, il sert de témoin négatif. Deux contrôles positifs avec le LPS d'*E. coli* K12 (Invivogen, USA) et les LTAs de *S. aureus* (Invivogen, USA) sont réalisés aux mêmes concentrations que les LTAs extraits des souches de *Bacillus*. Toutes les stimulations sont réalisées en triplicat.

6.2.2. Extraction des ARNs totaux et rétrotranscription en ADNc complémentaires

Après 4h d'incubation avec les LTAs purifiés, les cellules sont lavées à deux reprises avec du PBS 1X. Les ARNs cellulaires totaux sont extraits des cellules Caco-2 à l'aide d'un kit d'extraction d'ARN (RNeasy Kit, Qiagen, Pays-Bas). Les extraits sont prétraités avec une solution de DNase (DNA-free™ DNase Treatment and Removal Reagent Ambion®, Applied Biosystem, USA) afin d'éliminer toute trace d'ADN contaminant. L'ARN extrait est quantifié par spectrophotométrie UV à l'aide du système NanoDrop™ ND1000 (Thermo Fisher Scientific, USA) et la pureté est contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose 1.2% (p/v). Deux microgrammes de chaque ARN extrait sont rétro-transcrits en ADNc dans un volume final de 40 µL, grâce au système Maxima® Reverse Transcriptase (Fermentas, Thermo Fischer Scientific, USA) en utilisant des amorces oligo(dT) (Biomers, Allemagne) et des dNTP (Eurogentec, Belgique).

6.2.3. Quantification des gènes exprimés par qPCR en temps réel

Les amorces sélectionnées ont pour cibles des gènes impliqués dans les effets potentiels des bactéries probiotiques, afin de corrélérer ou non ces effets à la présence de LTAs. Les amorces ayant été mises au point au sein du laboratoire et n'étant pas encore publiées, leurs séquences ne seront pas communiquées. Les gènes cibles et leurs fonctions physiologiques sont les suivants :

- Inflammation : IL-1, IL-6, IL-8 (cytokines pro-inflammatoires); IL-10 (cytokines anti-inflammatoires),
- Sécrétion de mucine : MUC2 et MUC 13,
- Jonctions intercellulaires : cadherine1,
- Gène de référence : HPRT (hypoxanthine ribosyltransférase).

Le mélange PCR est réalisé en plaque 96 puits contenant pour chaque échantillon :

- 4,5 μ L d'eau PCR DNase free (Fermentas, USA),
- 6,5 μ L de iQ SYBR Green Supermix (Taq DNA polymerase, KCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgCl_2 , dUTP, SYBR Green) (Fermentas, USA),
- 0,5 μ L de chaque amorce (sens et anti-sens) à 10 pmol (Fermentas, USA),
- 1 μ L d'ADNc synthétisé.

L'amplification est réalisée par un iCycler real-time PCR Detection System (BioRad Laboratories, USA) dont le protocole d'amplification est le suivant :

- Dénaturation initiale (95°C, 10 min),
- Dénaturation (95°C, 15 s),
- Hybridation (30 s) à la température appropriée pour chaque amorce (59°C à 61°C),
- Amplification (72°C, 30 s),
- Répétition des trois dernières étapes durant 44 cycles.

La lecture de la plaque est réalisée pendant l'étape de dénaturation à $\lambda_{\text{ex}} = 494$ nm et $\lambda_{\text{em}} = 521$ nm. Le taux d'expression de chaque échantillon étudié est normalisé par rapport au gène de référence HPRT.

6.3. Quantification de la production de cytokines par les PBMCs, par la méthode ELISA

6.3.1. Préparation des cellules mononuclées périphériques du sang humain (PBMCs)

Des aliquots de 12 mL de sang provenant de donneurs sains sont récupérés au centre de prélèvement hématologique du CHU de Limoges, avec leur consentement et conformément aux lignes directrices approuvées par le Comité d'Expérimentation sur des sujets humains. Les PBMCs sont isolées du sang total par centrifugation à 2500 rpm pendant 20 min et à température ambiante dans un gradient de Ficoll (Eurobio, France). Les cellules sont lavées une fois avec du RPMI dépourvu de SVF puisensemencées en plaque 24 puits dans du milieu RPMI et à raison de 10^6 cellules par puit.

6.3.2. Stimulation des PBMCs et dosage des cytokines par ELISA

Les cellules sont incubées en présence des LTAs à 1 et 10 µg/mL pendant 24 h. Deux contrôles positifs ont été réalisés avec le LPS de *E. coli* K12 (InvivoGen, France) et les LTAs de *S. aureus* (InvivoGen, France) aux mêmes concentrations. Un contrôle négatif est réalisé dans les mêmes conditions avec du tampon acétate de sodium 5 mM/pH 4,7. Après centrifugation des plaques à 600 rpm pendant 10 min à température ambiante, les surnageants de culture sont collectés et conservés à -80°C en attendant le dosage par la méthode ELISA.

La quantité de TNF- α , d'IL-8 et d'IL-10 produite dans les surnageants de culture est déterminée en utilisant des kits de dosage commerciaux (PeproTech, France) selon le protocole du fabricant.

6.4. Mesure de la production de monoxyde d'azote (NO) par des macrophages murins RAW 264.7

Le monoxyde d'azote (NO) est produit lors des réactions inflammatoires par les cellules du système immunitaire (Marletta 1988). Le modèle utilisé *in vitro* est la cellule de macrophage murin transformé RAW 264.7. Le NO est produit sous forme radicalaire par l'enzyme iNOS (inducible NO synthase), à partir de la L-arginine. Le NO produit est oxydé en nitrites NO²⁻ stables. Ces derniers sont dosés dans le surnageant de culture selon la réaction de Griess (Green *et al.* 1982).

Les cellules RAW 264.7 sontensemencées à raison de 10 000 cellules par puits en plaque 96 puits. 24 h après l'ensemencement, les cellules sont incubées en présence de 0,1 µg/mL, 1 µg/mL et 10 µg/mL de LTAs purifiés, pendant 72 h et à 37°C. Un contrôle négatif (acétate de sodium 5 mM/pH 4,7) et deux contrôles positifs de qualité ultrapure (LPS extraits de *E. coli* K12 (InvivoGen, USA) et LTAs extraits de *S. aureus* (InvivoGen, USA), aux mêmes concentrations que les LTAs purifiés) sont réalisés.

La concentration en nitrites est déterminée en mélangeant un volume de surnageant à quatre volumes de réactif de Griess (acide sulfanilique 0,5% (p/v), acide acétique 1,4% (v/v), naphtyléthylène diamine 0,008% (p/v)) préparé extemporanément (Griess 1879). Après 15 min d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est lue à 535 nm contre un témoin adapté.

La concentration en nitrites dans le surnageant est déterminée en se référant à une droite étalon établie à partir d'une solution de NaNO₂ de 0,048 à 100 µM.

Partie C

Résultats et Discussion

Plan de la partie :

Caractérisation d'un synbiotique constitué par la souche probiotique *B. subtilis* CU1 associée à un substrat prébiotique isomaltooligosaccharide

1. Choix d'un couple probiotique/prébiotique
 2. Caractérisation des IMOS par chromatographie liquide et spectrométrie de masse
 3. Suivi de la croissance de *B. subtilis* CU1 sur IMOS
 4. Détermination de l'activité gluco-hydrolasique
 5. Suivi de la production d'acides gras à chaîne courte et d'acide lactique
 6. Analyse du protéome de *B. subtilis* CU1 par électrophorèse bidimensionnelle (2D-PAGE)
 7. Adhésion de *B. subtilis* CU1 aux cellules épithéliales intestinales
 8. Tolérance à la bile de *B. subtilis* CU1
 9. Influence de la source carbonée sur la structure d'entités moléculaires de la surface de *B. subtilis* CU1 : les acides lipotéichoïques
- Conclusion & perspectives

Etude de la relation structure/activité des acides lipotéichoïques de trois souches probiotiques du genre *Bacillus*

1. Extraction et purification des LTAs
 2. Caractérisations chimique et structurale des LTAs
 3. Détermination de l'activité biologique des LTAs purifiés
 4. Rôle de la D-alanine dans l'activité immunologique des LTAs
- Conclusion & perspectives

1

Evaluation du potentiel synbiotique d'une association de la souche probiotique *B. subtilis* CU1 avec un substrat prébiotique de type isomaltooligosaccharide

- PREAMBULE -

L'étude bibliographique et les travaux réalisés ces dernières années ont permis de mettre en évidence que les souches de *Bacillus* utilisées en tant que probiotiques ne pouvaient pas être réellement considérées comme colonisatrices du tractus intestinal, mais plutôt comme des résidents transitoires du microbiote, pouvant s'adapter à l'écosystème intestinal au cours de leur cycle de vie. Il est possible d'augmenter le temps de séjour de ces souches dans le tractus si les conditions, notamment nutritionnelles, sont favorables. De plus, les souches de *Bacillus*, commercialisées sous forme de spores pour leur résistance aux conditions extrêmes de l'estomac, pourraient repasser sous forme de cellules végétatives une fois dans l'intestin si les conditions, notamment nutritionnelles redeviennent favorables. Au cours de ces travaux, nous nous proposons d'étudier les effets de l'addition d'une source carbonée prébiotique à une souche probiotique du genre *Bacillus*, dans le but de favoriser la germination de cette dernière une fois dans l'intestin, consécutivement à l'augmentation de l'apport en nutriments. L'amélioration du développement de la souche dans le tractus devrait permettre de favoriser ses effets bénéfiques sur la santé de l'hôte.

La combinaison d'un prébiotique avec un probiotique du genre *Bacillus* est très peu étudiée. Ceci est probablement lié au fait que les prébiotiques sont principalement mis en œuvre dans le but de favoriser la croissance de bactéries commensales de l'intestin des genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*. Quelques études ont été réalisées sur une association prébiotiques/*Bacillus* probiotique (Tableau 17) mais une seule s'est intéressée à la combinaison d'un *Bacillus* probiotique et d'IMOS.

Combinaison synbiotique testée	Etude	Références
<i>Bacillus clausii</i> OJ Isomaltooligosaccharides	Effet synergique des IMOS et du probiotique sur la santé de la crevette (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	(Li <i>et al.</i> 2009)
<i>Bacillus subtilis</i> <i>Enterococcus faecium</i> Lactulose	Etude sur 216 patients atteints de constipation. Effets renforcés du synbiotique en comparaison au lactulose seul	(Li <i>et al.</i> 2012)
<i>Bacillus subtilis</i> UKM 5139 et 5140 Lactitol et lactulose	Stimulation de la croissance <i>in vitro</i> , mais pas d'influence des prébiotiques sur l'adhésion des deux souches de <i>Bacillus</i>	(Avdeeva <i>et al.</i> 2011) (Kharkhota <i>et al.</i> 2011)
<i>Bacillus subtilis</i> CECT 35 Inuline	Pas de modification de la morphologie de la muqueuse intestinale chez la dorade, mais diminution de la diversité microbienne	(Cerezuela <i>et al.</i> 2013)
<i>Bacillus subtilis</i> Chitosan	Stimulation de la croissance et de l'immunité innée, et meilleure résistance aux maladies chez le cobia (<i>Rachycentron canadum</i>)	(Geng <i>et al.</i> 2011)
<i>Bacillus licheniformis</i> Fructooligosaccharides	Stimulation de l'immunité innée et de l'activité antioxydante, et meilleure résistance aux maladies chez la brème (<i>Megalobrama terminalis</i>)	(Zhang <i>et al.</i> 2013)
<i>Bacillus subtilis</i> Fructooligosaccharides	Stimulation de la réponse immunitaire et meilleure résistance aux maladies chez la liche (<i>Trachinotus ovatus</i>)	(Zhang <i>et al.</i> 2014)

Tableau 17: Principales études concernant l'association d'un prébiotique avec un probiotique du genre *Bacillus*

Afin d'optimiser le choix d'un synbiotique, il est essentiel de connaître l'influence du prébiotique sur le métabolisme et la physiologie de la bactérie probiotique. Dans un premier temps, un couple probiotique/prébiotique a été déterminé sur le critère de la capacité du microorganisme à se développer avec le substrat prébiotique comme unique source carbonée. La suite de l'étude fait l'investigation de l'effet du prébiotique sur la physiologie de la souche de *Bacillus* probiotique sélectionnée.

1. Choix d'un couple probiotique/prébiotique

Le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles en partenariat avec le Laboratoire de Microbiologie de Bordeaux Sciences Agro travaillent depuis plusieurs années sur différentes souches de *Bacillus* probiotiques commerciales, dans le but de comprendre les mécanismes à l'origine de leurs effets bénéfiques. Il est indispensable lorsque l'on entreprend ce genre d'investigation de travailler sur des souches commerciales caractérisées. Nous avons sélectionné un panel large de souches de *Bacillus* commercialisées en tant que probiotiques, puis nous avons dans un premier temps déterminé leur capacité à utiliser des oligosaccharides prébiotiques comme source carbonée pour leur croissance. Les souches de travail sont les suivantes :

- *Bacillus amyloliquefaciens* 26D
- *Bacillus cereus* CH
- *Bacillus clausii* O/C
- *Bacillus liqueniformis* BL31
- *Bacillus subtilis* CU1
- *Bacillus subtilis* 11-89
- *Bacillus subtilis* 406j
- *Bacillus subtilis* 2-4/2

Les oligosaccharides prébiotiques sont sélectionnés sur le critère de leurs différences structurales, afin de disposer d'un panel de travail le plus large possible, représentatif des prébiotiques les plus couramment utilisés. Une part importante des oligosaccharides prébiotiques d'intérêt ne sont pas disponibles en Europe, mais principalement sur le marché asiatique. Les oligosaccharides prébiotiques utilisés au cours de cette étude, ainsi que les éléments sur leurs structures communiquées par les fournisseurs, sont regroupés dans le Tableau 18.

Données fournisseur		
Nom	Description	Degré de polymérisation (DP)
Inuline	Polymère d'unités de D-fructose liées en $\beta(2\rightarrow1)$, terminé par un résidu glucose	DP 25
FOS	Polymère d'unités de D-fructose liées en $\beta(2\rightarrow1)$, terminé par un résidu glucose	DP < 9
GOS	Polymère d'unités galactose liées en $\alpha(1\rightarrow6)$, terminé par un résidu saccharose/glucose	3 < DP < 11
Lactulose	Disaccharide galactose-fructose liés en $\beta(1\rightarrow4)$	DP 2
GlcOS	Polymère d'unités glucose liées en $\alpha(1\rightarrow2)$ et en $\alpha(1\rightarrow6)$	DP > 4
SOS	Polymère d'unités glc, gal et fru (trisaccharide raffinose ou tétrasaccharide stachyose)	-
XOS	Polymères de xylose liés en $\beta(1\rightarrow4)$	1 < DP < 5
AXOS	Polymères de xylose liés en $\beta(1\rightarrow4)$	-
IMOS	Polymère d'unités glucose liées en $\alpha(1\rightarrow6)$	2 < DP < 10

Tableau 18 : Prébiotiques sélectionnés pour l'étude et informations sur les structures communiquées par les fournisseurs

La mesure de croissance des différentes souches probiotiques sur chaque oligosaccharide est réalisée sur milieu minimum gélosé. Après 20 h de croissance, l'analyse est réalisée de manière qualitative par simple observation de la taille des colonies et en comparaison à une référence glucose, ose le plus rapidement métabolisable par les bactéries. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 19.

	Croissance										
	Milieu minimum	Glucose	Inuline	FOS	GOS	GlcOS	XOS	AXOS	Lactulose	SOS	IMOS
<i>B. cereus</i> CH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>B. clausii</i> O/C	-	++	+	+	++	+	++	+	-	++	++
<i>B. amyloliquefaciens</i> 26D	-	++	+	+	+	++	++	+	-	++	++
<i>B. liqueniformis</i> BL31	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
<i>B. subtilis</i> 11-89	-	++	+	+	+	+	+	+	-	++	++
<i>B. subtilis</i> 406j	-	+	+	+	+	+	+	+	-	++	++
<i>B. subtilis</i> 2-4/2	-	++	+	+	+	+	+	+	-	++	+
<i>B. subtilis</i> CU1	-	++	+	+	++	+	++	+	-	++	++

- Pas de croissance
+ Faible croissance
++ Croissance

Tableau 19 : Observation visuelle en milieu solide de la croissance de souches probiotiques du genre *Bacillus* sur différentes sources carbonées prébiotiques.

Les résultats montrent qu'aucune des souches n'est capable de croître sur le milieu minimum en absence de source carbonée (contrôle négatif). Il est important de noter que *B. cereus* CH ne se développe pas sur la plupart des sources carbonées prébiotiques testées. Ceci laisse supposer qu'il manque, dans le milieu minimum, un élément nutritif nécessaire à sa croissance, comme par exemple un acide aminé pour lequel il serait auxotrophe¹. En présence de SOS, il semblerait que cette carence soit partiellement compensée. Etant donné que les SOS sont purs à 80%, il pourrait y avoir dans les 20% restant la présence du ou des composés pour lequel il serait auxotrophe, permettant son développement. A l'exception du lactulose, tous les autres prébiotiques testés semblent permettre la croissance des souches étudiées, à l'exception de *B. cereus* CH. Parmi l'ensemble de ces oligosaccharides, les SOS et les IMOS semblent favoriser la production d'exopolysaccharides ou EPS (halo plus important observé autour des colonies).

¹ Organisme caractérisé par son incapacité à synthétiser un composé organique essentiel à son développement, comme un acide aminé par exemple.

La production d'EPS peut être une caractéristique intéressante pour un probiotique étant donné leur implication dans l'adhésion aux surfaces et l'immunomodulation (Fanning *et al.* 2012). Cependant, les SOS commerciaux ne sont purs qu'à 80%. Il est difficile de réaliser une étude scientifique sur un composé qui n'est pas suffisamment pur et caractérisé. Pour cette raison, nous avons choisi d'orienter notre travail vers l'étude des IMOS. De plus, les IMOS sont un hydrolysat d'amidon et un nombre important de souches du genre *Bacillus* sont connues pour pouvoir se développer avec de l'amidon comme substrat carboné (Holt *et al.* 1994). Malgré la digestibilité partielle des IMOS par les enzymes humaines, le caractère prébiotique de ces derniers a été établi par plusieurs études, mettant en évidence des effets bénéfiques comme l'augmentation du nombre de bifidobactéries et de lactobacilles dans le côlon (Ketabi *et al.* 2011; Likotrafiti *et al.* 2014), l'augmentation de la réponse immunitaire chez la souris (Mizubuchi *et al.* 2005), la réduction des niveaux de colonisation par *Salmonella typhimurium* chez le poulet (Thitaram *et al.* 2005), la réduction de la prise de poids et de masse adipeuse chez le rat obèse (Belobrajdic *et al.* 2012), et la réduction de la constipation chez l'Homme (Yen *et al.* 2011).

Le choix de la souche probiotique à associer avec le prébiotique a été conditionné par les connaissances actuelles sur la bactérie, ainsi que les applications industrielles potentielles qui lui sont associées. Plusieurs des souches testées auraient pu être des candidates potentielles, mais la souche *B. subtilis* CU1, qui est utilisée dans la préparation commerciale Probisis[®], a fait l'objet de plusieurs études au laboratoire. Par conséquent, nous avons défini le couple *B. subtilis* CU1/IMOS comme une association d'intérêt pour cette étude.

2. Caractérisation des IMOS par chromatographie liquide et spectrométrie de masse

Afin d'identifier la structure des IMOS commerciaux utilisés au cours de l'étude, nous avons vérifié la répartition des degrés de polymérisation de l'oligosaccharide dans le produit et identifié les liaisons glycosidiques entre les unités glucose. Dans un premier temps, une analyse par chromatographie liquide sur colonne Rezex[®] Oligo Ag⁺ (4%) (Phenomenex, USA) a permis de déterminer la répartition des DP des oligosaccharides constitutifs des IMOS (Figure 17).

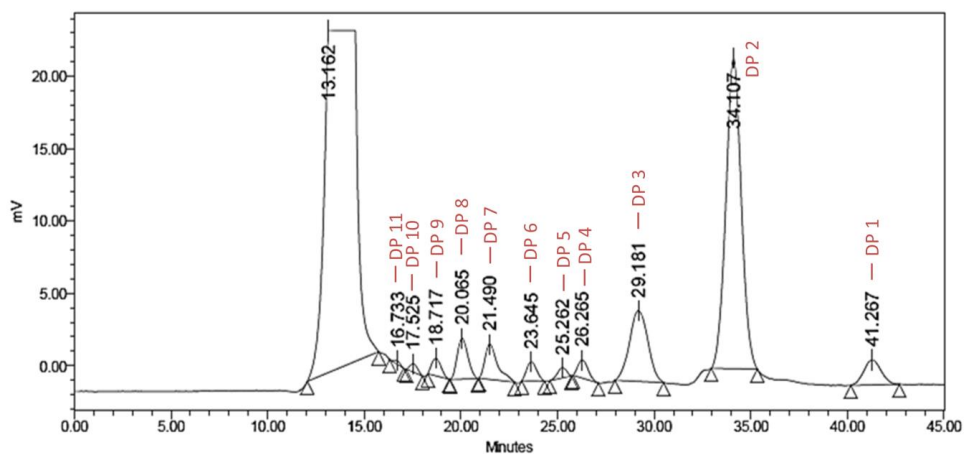


Figure 17: Séparation des IMOS sur colonne Rezex® Oligo Ag⁺ (4%)

Les IMOS ont été séparés sur le critère de leur DP, les oligosaccharides sont élués dans l'ordre croissant de leur masse moléculaire. Des fractions chromatographiques correspondant à chacun des pics d'élution (Figure 17) ont été collectées et analysées par spectrométrie de masse (MALDI-MS) afin de déterminer le DP de chacun des composés séparés. En théorie, la colonne Rezex® permet de séparer des DP dans une gamme dynamique allant de DP 1 à DP 14, mais nous n'avons pas obtenu une résolution supérieure à DP 11. Au-delà de ce degré de polymérisation, les oligosaccharides sont élués dans le volume mort.

Afin de connaître la répartition des degrés de polymérisation supérieurs à 11, une analyse par spectrométrie de masse avec une ionisation MALDI a été réalisée sur le même échantillon. L'analyse a été réalisée en mode réflecteur, plus sensible, (Figure 18 A) pour déterminer la masse des faibles DP (compris entre 3 et 13) et en mode linéaire (Figure 18 B) pour les plus hauts poids moléculaires.

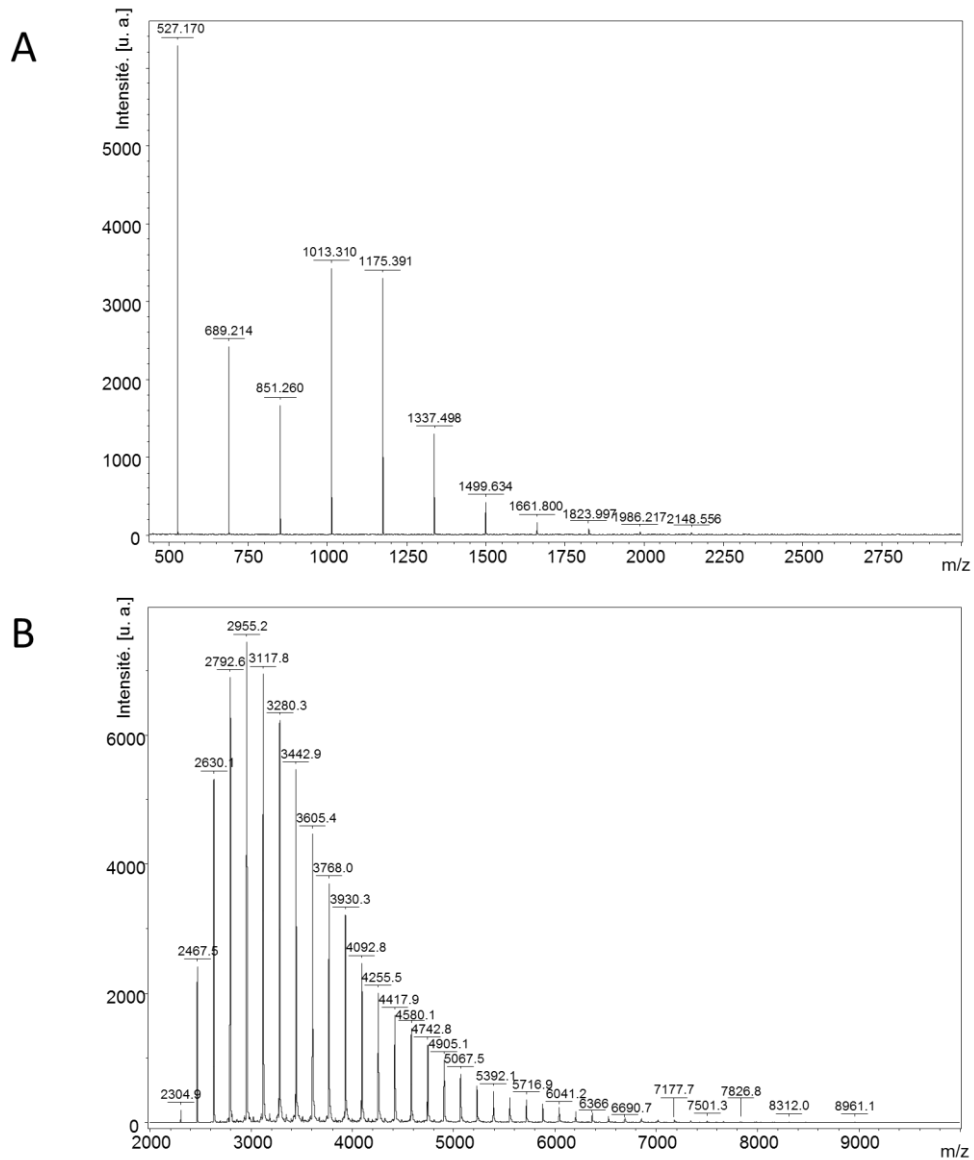


Figure 18: Analyse des IMOS par spectrométrie de masse en MALDI-TOF (A) en mode réflecteur (B) en mode linéaire

Les résultats obtenus montrent l'importante diversité des DP dans l'échantillon commercial d'IMOS, allant de DP 1 à DP 56. Ces résultats sont résumés sous forme d'histogramme (Figure 19) afin de mieux représenter la distribution des DP des IMOS.

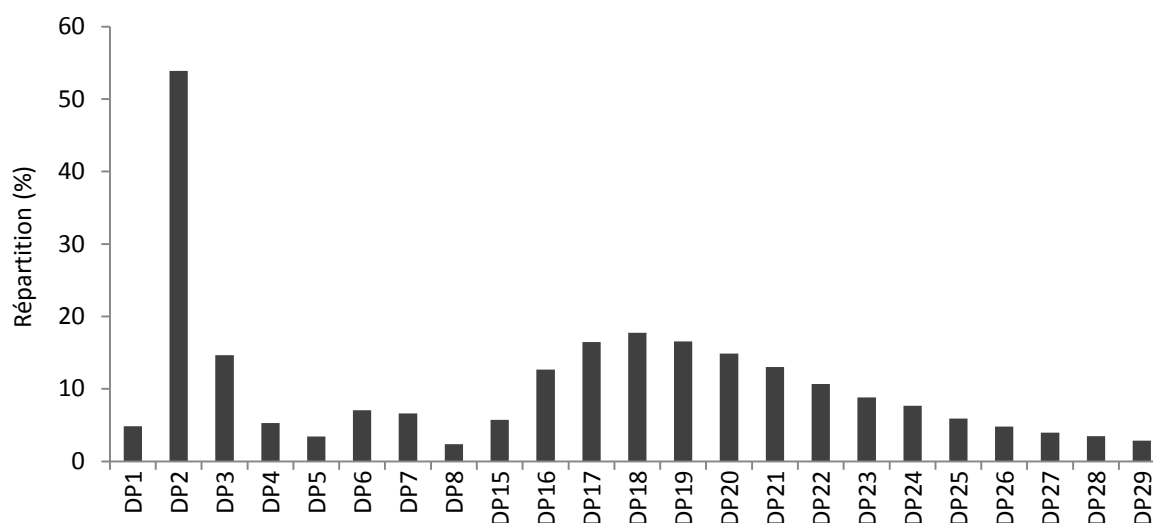


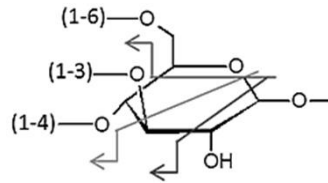
Figure 19: Distribution en pourcentage (p/p) des degrés de polymérisation des IMOS.

Il est important de noter qu'il y a une répartition des oligosaccharides en deux sous-populations majoritaires : une première qui regroupe les oligosaccharides de DP 2 et DP 3 et qui représente plus de 70% (p/p) de la préparation commerciale, et une seconde qui regroupe une population allant de DP 16 à DP 22. La présence d'oligosaccharides avec des hauts poids moléculaires serait attribuable à une hydrolyse incomplète de l'amidon lors de la préparation.

Les IMOS de DP 2 peuvent être en partie hydrolysés par les enzymes des cellules épithéliales intestinales. Bien qu'il y ait peu d'information concernant la digestibilité de l'isomaltotriose et du panose (DP 3), les oligosaccharides de DP supérieur à 3 sont considérés comme non-digestibles (Ko *et al.* 1992; Kaneko *et al.* 1995).

Afin de contrôler le type de liaison unissant les unités glucose entre elles, la fraction chromatographique contenant les IMOS de DP 6 est analysée par ESI-MS. Lors de l'ionisation, les divers branchements entre les sous-unités osidiques entraînent la production de différents fragments intracycliques caractéristiques.

En mode positif, les liaisons entre des unités glucose peuvent produire les fragments intracycliques suivant :



- Liaison (1→3) : fragment majoritaire à -90 (50%) (-60 : 30%, -120 : 20%),
- Liaison (1→4) : fragment majoritaire à -60 (90%) (-90 : 5%, -120 : 5%),
- Liaison (1→6) : fragment majoritaire à -60 (60%) (-90 : 30%, -120 : 10%).

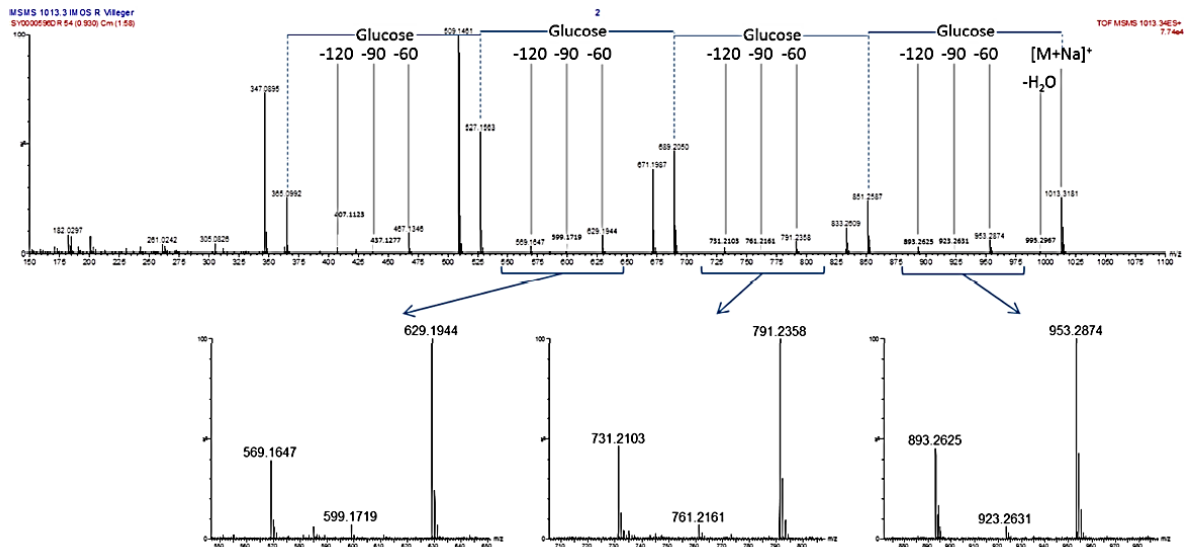


Figure 20: Spectre de masse ESI-MSMS des IMOS de DP 6.

Le spectre obtenu, présenté Figure 20, confirme un enchainement d'hexoses. Les fragments intracycliques mettent en évidence la très faible proportion du pic à -90, ce qui exclut l'existence de liaison $\alpha(1\rightarrow3)$. La proportion entre les pics à -60 et à -120 semblerait indiquer un mélange entre des liaisons $\alpha(1\rightarrow4)$ et $\alpha(1\rightarrow6)$ (Figure 21).

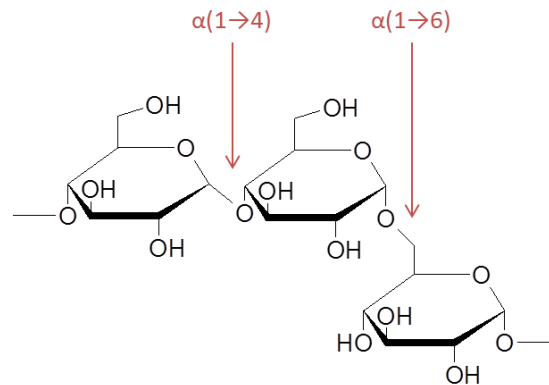


Figure 21: Structure générale des IMOS commerciaux déterminée par spectrométrie de masse ESI-MS

Les IMOS ne sont pas uniquement constitués d'unités glucose liées par des liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$, il s'agirait d'un oligomère plus complexe, présentant des liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$ et $\alpha(1\rightarrow4)$. Ces observations sont en accord avec la structure de l'amidon dont sont issus les IMOS, lui-même composé d'unités glucose liées en $\alpha(1\rightarrow6)$ et $\alpha(1\rightarrow4)$. L'amidon est un homopolymère de glucose que l'on trouve sous deux formes : l'amylose et l'amylopectine. L'amylose est une structure linéaire de glucose liés en $\alpha(1\rightarrow4)$ avec des DP allant de 100 à 10000, tandis que l'amylopectine est composée de chaînes linéaires d'unités glucose liées en $\alpha(1\rightarrow4)$, présentant des branchements $\alpha(1\rightarrow6)$ avec des DP pouvant dépasser 60000. L'hydrolyse de l'amidon est réalisée industriellement par voie enzymatique, via l'utilisation d'une α -amylase. Il est probable que l'hydrolyse de l'amidon ne soit pas totale, ce qui justifie que des liaisons $\alpha(1\rightarrow4)$ subsistent dans la structure. La plupart des études réalisées sur les IMOS ne font pas état d'une analyse exhaustive de leur structure, un élément toutefois indispensable pour expliquer l'origine de leurs potentiels effets bénéfiques. Les connaissances acquises sur la structure des IMOS seront mises à profit dans la suite de notre étude.

3. Suivi de la croissance de *B. subtilis* CU1 sur IMOS

3.1. Détermination des cinétiques de croissance

Le suivi de croissance de *B. subtilis* CU1 au cours du temps est réalisé en milieu minimum liquide afin d'observer le rôle spécifique de la source carbonée sur la croissance de la souche. Le substrat carboné est ajouté à raison de 1% (p/v) au milieu minimum. Il estensemencé par 1% d'une préculture de 12 h réalisée sur le même substrat. Le suivi est réalisé par mesure de DO à 595 nm (Figure 22 A) et par détermination du nombre d'UFC/mL après dénombrement sur gélose (Figure 22 B). Le substrat IMOS est comparé au substrat de référence glucose, et une troisième condition avec un

mélange de glucose et d'IMOS dans les mêmes proportions (0,5% (p/v) de chaque) a également été testée :

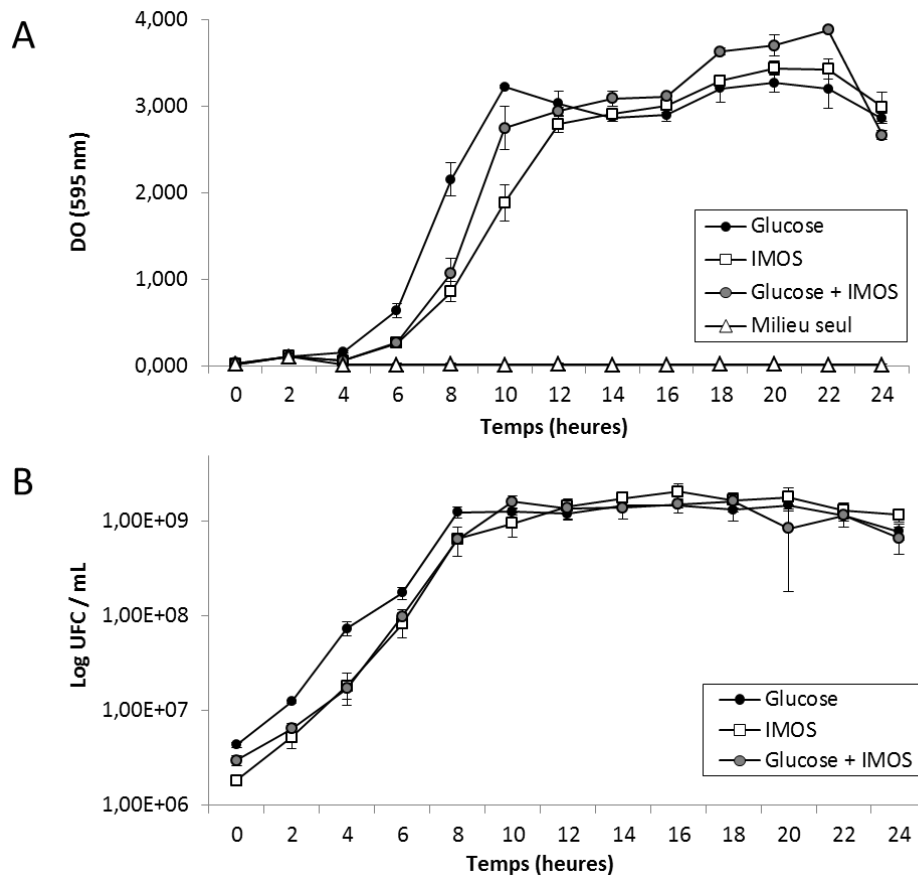


Figure 22: Représentation des cinétiques de croissance de *B. subtilis* CU1 en milieu minimum sur glucose, IMOS, glucose/IMOS et milieu seul, établies par mesure de DO à 595 nm (A), et par numération sur gélose (B).

Un contrôle négatif de croissance est réalisé en milieu minimum et en absence de source carbonée. Aucune croissance n'est observée après 48 h (Figure 22 A). Les cinétiques de croissance obtenues par mesure de DO à 595 nm sont assez similaires sur les deux sources carbonées utilisées séparément. Ainsi, il semblerait que la source carbonée IMOS soit presque aussi aisément métabolisable par la bactérie que l'est le glucose. En revanche, un temps de génération plus élevé a été observé sur IMOS (85,2 min, estimé à partir du taux de croissance spécifique) comparativement au substrat glucose (63 min, estimé dans les mêmes conditions). De plus, la phase de latence sur glucose est légèrement plus courte comparativement à celle observée sur IMOS (environ 3 h contre 4 h). En ce qui concerne les cinétiques de croissance obtenues par numération sur gélose, l'allure générale des courbes est tout à fait corrélable à celles obtenues par mesure de DO à 595 nm.

Lorsque les deux substrats sont en mélange, un phénomène de dioxie pourrait être envisagé, bien que les courbes de croissance ne permettent pas de confirmer cette hypothèse. Il est probable que le substrat glucose soit utilisé en premier du fait de son caractère facilement catabolisable par la souche, et ensuite les IMOS seraient consommés, consécutivement à une réorganisation métabolique de *B. subtilis*.

3.2. Utilisation de la source carbonée lors de la croissance sur IMOS

La consommation des oses a été déterminée au cours de la croissance de *B. subtilis* CU1 avec les IMOS comme unique source de carbone (Figure 23 A), et sur le mélange glucose/IMOS (Figure 23 B). Pour cela, la concentration en oligosaccharides de DP1 à DP3 a été déterminée par analyse chromatographique sur colonne Rezex[®] des surnageants de culture.

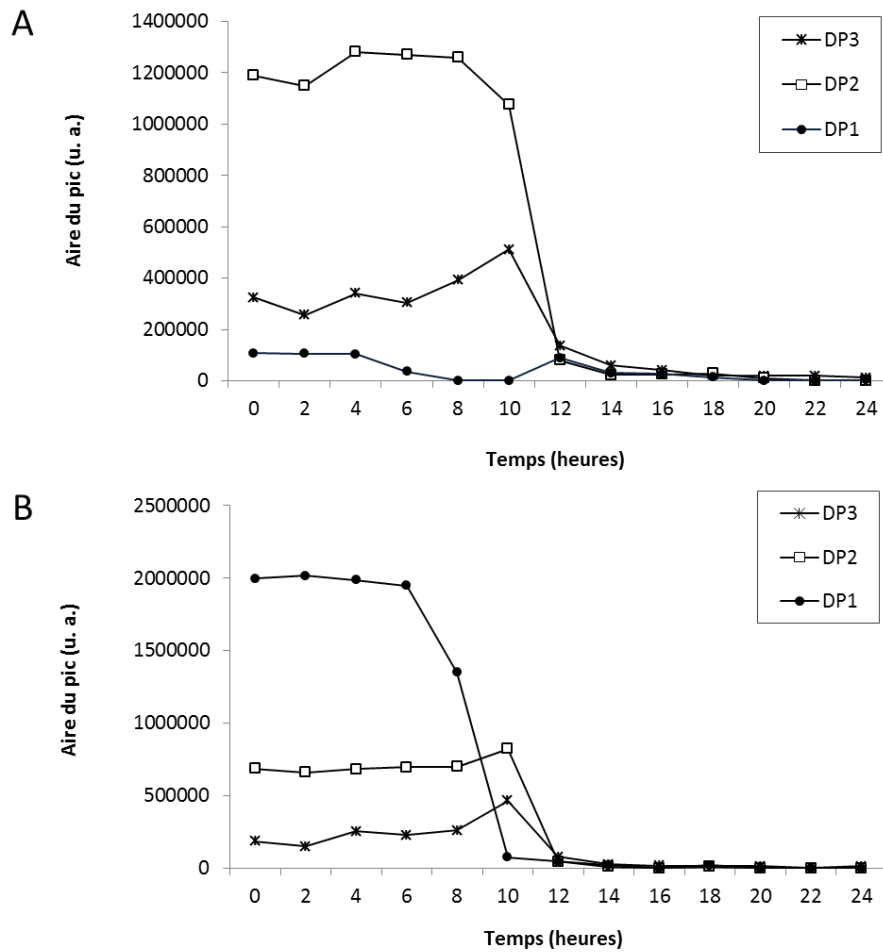


Figure 23: Analyse quantitative par chromatographie liquide sur colonne Rezex® des oligosaccharides dans le surnageant de culture de *B. subtilis* CU1 au cours de la croissance sur IMOS comme unique source carbonée (A), et sur glucose/IMOS en mélange (B)

Les résidus glucose (DP1) présents dans les IMOS commerciaux sont consommés en premier par la bactérie (Figure 23 A). Des résultats similaires ont été obtenus lorsque le milieu de culture contient à la fois du glucose et des IMOS (Figure 23 B). Cela suggère que, quelle que soit la concentration en glucose initiale dans le milieu, le glucose est le substrat carboné qui sera métabolisé en premier par la bactérie. Les degrés de polymérisation supérieurs (DP2 et DP3) sont métabolisés après la consommation totale du glucose.

Sur la Figure 23 A, les résidus glucose ont totalement disparu du milieu après 8 h de croissance, puis la concentration en glucose augmente entre 12 h et 14 h de croissance jusqu'à atteindre à nouveau son niveau initial. Dans un même temps, les plus hauts DP sont consommés à leur tour. De plus, une légère augmentation de la concentration en oligosaccharides de DP2 et DP3 est observable juste avant qu'ils soient à leur tour consommés par la souche (temps 10 h). Ces résultats laissent supposer que les

oligosaccharides avec les plus hauts DP seraient hydrolysés en oligosaccharides de plus faibles DP directement dans le milieu de culture. La souche va utiliser préférentiellement les oligosaccharides de faibles masses moléculaires, puis ceux de plus hautes masses moléculaires consécutivement à leur hydrolyse par des enzymes extracellulaires. Cela suppose qu'une glycohydrolase pourrait être excrétée par la souche, directement dans le surnageant de culture, au cours de sa croissance.

Etant donné que les IMOS sont constitués d'unités glucose liées à la fois en $\alpha(1\rightarrow4)$, et en $\alpha(1\rightarrow6)$, un suivi par chromatographie en phase normale sur colonne Aminopropyle est mis en œuvre pour quantifier séparément le maltose et l'isomaltose, qui possèdent tous les deux le même DP. Les résultats ont été exprimés en concentration, en mmol/L, afin de comparer les proportions des deux dimères dans le surnageant de culture. Les résultats sont présentés Figure 24.

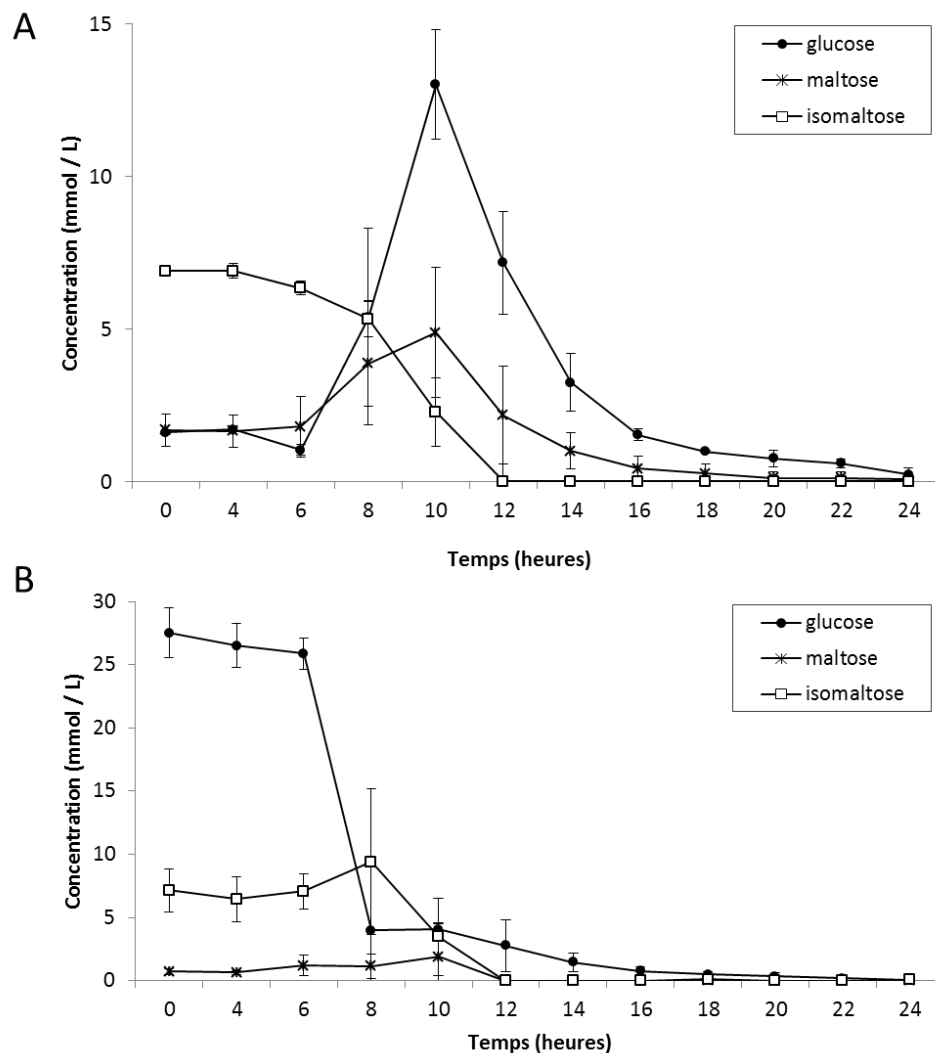


Figure 24: Dosage par chromatographie liquide sur colonne Aminopropyle du glucose, maltose et isomaltose dans le surnageant de culture de *B. subtilis* CU1 au cours de la croissance. IMOS comme unique source carbonée (A) ; glucose/IMOS en mélange (B)

Les résultats obtenus sur colonne Aminopropyle sont en accord avec ceux obtenus précédemment sur colonne Rezex[®]. En effet, la source carbonée glucose est la première à être métabolisée par la bactérie (dans les 6 premières heures), puis ce sont les degrés de polymérisation plus élevés qui sont ensuite utilisés. Sur la Figure 24 A, on peut à nouveau observer une importante augmentation de la concentration en glucose, probablement consécutive à l'hydrolyse des oligosaccharides de DP supérieurs. De plus, ces résultats montrent qu'à T = 0, l'isomaltose est en proportion bien supérieure à celle observée pour le maltose. L'isomaltose est utilisé assez rapidement par la souche, dès 6 h de culture, tandis que l'on observe une augmentation significative de la concentration en maltose entre 6 h et 10 h. Il est possible que les IMOS de degrés de polymérisation plus élevés soient hydrolysés préférentiellement en unités maltose, et non en isomaltose. Dans ce cas, les liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$ seraient hydrolysées en priorité, conduisant à la formation de maltose, disaccharide composé de deux unités glucose liées en $\alpha(1\rightarrow4)$. Le maltose ainsi produit est par la suite utilisé par la bactérie.

Dans le cas où les deux sources carbonées sont en mélange (Figure 24 B), l'augmentation de la concentration en maltose vers 10 h apparaît moins marquée. Il semblerait que l'importante concentration en glucose dans le milieu inhibe l'hydrolyse d'oligosaccharides de DP plus élevés.

Afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle une glucosidase serait excrétée dans le milieu de culture permettant ainsi l'hydrolyse des IMOS, l'activité glyco-hydrolasique de *B. subtilis* CU1 est déterminé par la suite.

4. Détermination de l'activité glyco-hydrolasique

La détermination d'activités hydrolasiques induites par un substrat prébiotique compte parmi les informations nécessaires à la compréhension des mécanismes impliqués dans l'utilisation de ce substrat, et donc des effets bénéfiques que peut apporter la source carbonée à la bactérie probiotique.

4.1. Détermination du type d'activité glyco-hydrolasique dans le cytosol et le surnageant de culture de *B. subtilis* CU1

Dans un premier temps, à l'aide de substrats chromogènes, les activités α -glucosidase, β -glucosidase, α -galactosidase et β -galactosidase ont été mesurées à la fois dans le surnageant de culture

et le cytosol de *B. subtilis* CU1, consécutivement à la croissance de la souche en milieu minimum supplémenté à 1% en glucose (contrôle) ou 1% en IMOS (Figure 25).

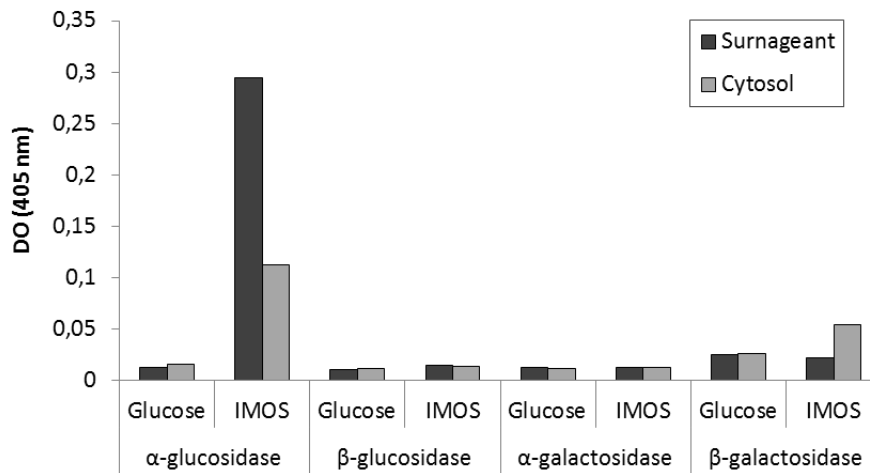


Figure 25: Détermination des activités glyco-hydrolasiques dans le cytosol et le surnageant de culture de *B. subtilis* CU1, après croissance sur glucose ou IMOS comme substrats uniques. Les résultats présentés sont la moyenne de deux expériences indépendantes.

Les résultats obtenus lors de la détermination des activités glyco-hydrolasiques révèlent la présence importante d'une activité α -glucosidase dans le cytosol de *B. subtilis*, mais également dans le surnageant de culture, lors de la croissance en milieu contenant des IMOS comme unique source carbonée. Cela confirme l'hypothèse précédente selon laquelle la synthèse d'une α -glucosidase est induite chez *B. subtilis* CU1, en présence d'IMOS. Cette enzyme est à la fois retrouvée dans le cytosol, et dans le surnageant de culture, ce qui suggère son excrétion au cours de la croissance de la bactérie.

Aucune activité α -glucosidase n'est mise en évidence lors d'une croissance sur un substrat glucose. On peut noter également qu'aucune activité β -glucosidase ou α -galactosidase n'est présente, quelle que soit la source carbonée utilisée.

On observe la présence d'une faible activité β -galactosidase dans le cytosol et le surnageant de culture, lorsque *B. subtilis* CU1 est cultivé sur glucose et sur IMOS. Il pourrait s'agir d'une enzyme constitutive de la souche qui est exprimée à un niveau basal.

4.2. Suivi de l'activité α -glucosidase au cours de la croissance

Après avoir démontré que la croissance sur un milieu où les IMOS constituent l'unique source carbonée induit une activité α -glucosidase par *B. subtilis* CU1, un suivi cinétique de l'apparition de cette activité est réalisé toutes les 2 h. Afin de vérifier si l'induction de l'activité est réprimée en présence de glucose, la même expérience est réalisée sur un milieu de culture où le glucose et les IMOS sont utilisés en mélange comme sources carbonées. Les résultats sont présentés Figure 26 :

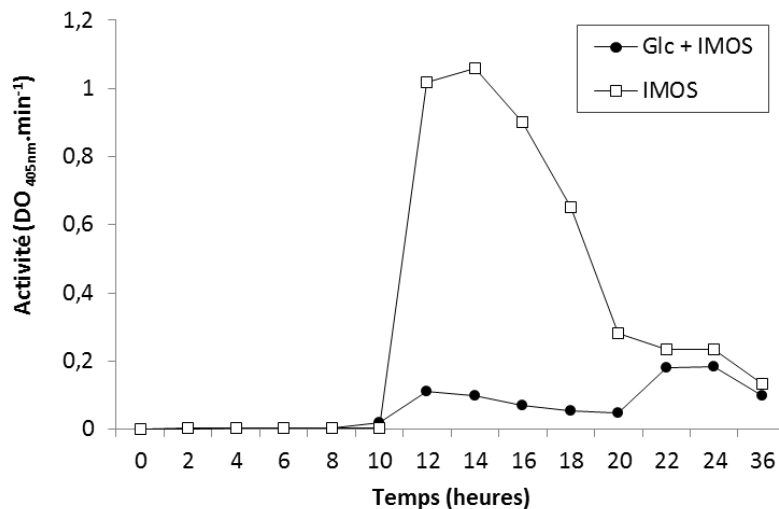


Figure 26: Suivi cinétique de la production de l'activité α -glucosidase dans le surnageant de *B. subtilis* CU1 avec les IMOS comme unique source carbonée ou en mélange avec du glucose. Les résultats présentés sont la moyenne de deux expériences indépendantes.

Lorsque les IMOS constituent l'unique substrat carboné dans le milieu de culture, une très importante activité α -glucosidase est observée dans le surnageant après 10 h de culture. En revanche, lorsque le glucose et les IMOS sont en mélange, cette activité n'augmente que progressivement après 10 h et 22 h de croissance, et se maintient à un niveau faible, comparativement à l'activité mesurée en présence d'IMOS seuls.

Si l'on superpose la mesure de l'activité α -glucosidase au cours du temps avec la courbe de croissance de *B. subtilis* en présence d'IMOS (Figure 22), nous pouvons constater que l'augmentation de l'activité n'est pas corrélable à l'augmentation de la biomasse bactérienne. En effet, la phase exponentielle de croissance commence vers 5 h et se termine vers 12 h, tandis que l'augmentation de l'activité glucosidase n'est observée qu'à partir de 10 h. Cela suggère que la souche métabolise dans un premier temps des oligosaccharides, probablement de faibles DP comme l'isomaltose et le maltose,

déjà présents dans le mélange d'IMOS. Une fois ces substrats consommés, la bactérie va sécréter une α -glucosidase directement dans le milieu de culture afin d'hydrolyser des oligosaccharides de DP plus élevés, ce qui est observé en fin de phase exponentielle. Ces résultats sont en accord avec les observations faites précédemment et concernant l'utilisation des oligosaccharides présents dans le milieu.

Lorsque les deux substrats, glucose et IMOS, sont en mélange dans le milieu de culture, les résultats suggèrent que le glucose est un répresseur de l'activité α -glucosidase. En effet, l'activité augmente à partir de 10 h mais reste à un niveau relativement faible. Cela suppose que la bactérie utilise le glucose dans un premier temps, puis les IMOS de faibles DP, et ensuite les IMOS de plus haut DP sont hydrolysés grâce à la sécrétion de l' α -glucosidase. Ces résultats sont également en accord avec ceux obtenus lors du dosage des oligosaccharides par chromatographie. De plus, ces résultats confortent l'hypothèse selon laquelle l'activité α -glucosidase serait spécifiquement induite en présence d'IMOS, et que le glucose puisse être un répresseur de cette même activité (Yamamoto *et al.* 2001).

Les protéines sécrétées par les bactéries sont impliquées dans l'hydrolyse de polymères, dans la liaison aux substrats, dans la sécrétion d'autres protéines, ou encore dans la mise en place de certains processus post-phase exponentielle comme la sporulation (Pooley *et al.* 1996). Le fait que la sécrétion de cette enzyme soit spécifique de l'utilisation des IMOS par la souche *B. subtilis* CU1 peut présenter un intérêt pour l'utilisation de cette souche probiotique avec les IMOS. En effet, les changements métaboliques peuvent entraîner des modifications de composition des protéines de la surface bactérienne, pouvant jouer un rôle dans l'interaction avec les cellules de l'hôte. Ainsi, la sécrétion spécifique d'une α -glucosidase par la souche *B. subtilis* CU1 en présence d'IMOS pourrait intervenir dans l'interaction probiotique-hôte (Lebeer *et al.* 2010), et être à l'origine de potentiels effets bénéfiques qui resteraient à mettre en évidence.

A l'heure actuelle, et malgré l'importance potentielle des protéines sécrétées par les bactéries probiotiques, très peu de données sont disponibles concernant leur identité. Nous avons mis en œuvre des expérimentations afin d'identifier l' α -glucosidase sécrétée et mise en évidence dans le surnageant. Son identification est actuellement en cours.

5. Suivi de la production d'acides gras à chaîne courte et d'acide lactique

L'activité métabolique du microbiote intestinal conduit à la production d'acide lactique et d'acides gras à chaîne courte, principalement les acides acétique, propionique et butyrique. L'acide butyrique peut servir de source énergétique pour les cellules épithéliales intestinales, et stimuler la croissance des cellules épithéliales du côlon (Donohoe *et al.* 2011). L'acide butyrique et l'acide propionique stimulent l'apoptose chez des lignées cellulaires de carcinome du côlon humain (Roy *et al.* 2009). Des propriétés anti-inflammatoires ont été rapportées pour les acides acétique, propionique et butyrique (Tedelind *et al.* 2007).

Nous avons comparé la production d'AGCC par *B. subtilis* CU1 lors de sa culture en présence de glucose ou d'IMOS comme unique substrat carboné. Les concentrations en acides lactique, acétique, propionique, butyrique, iso-butyrique, valérique et iso-valérique dans le surnageant de culture après 8 h, 12 h, 24 h et 36 h ont été déterminées par chromatographie liquide sur colonne HPX87[®] (Biorad, USA). Les résultats obtenus sont présentés Figure 27.

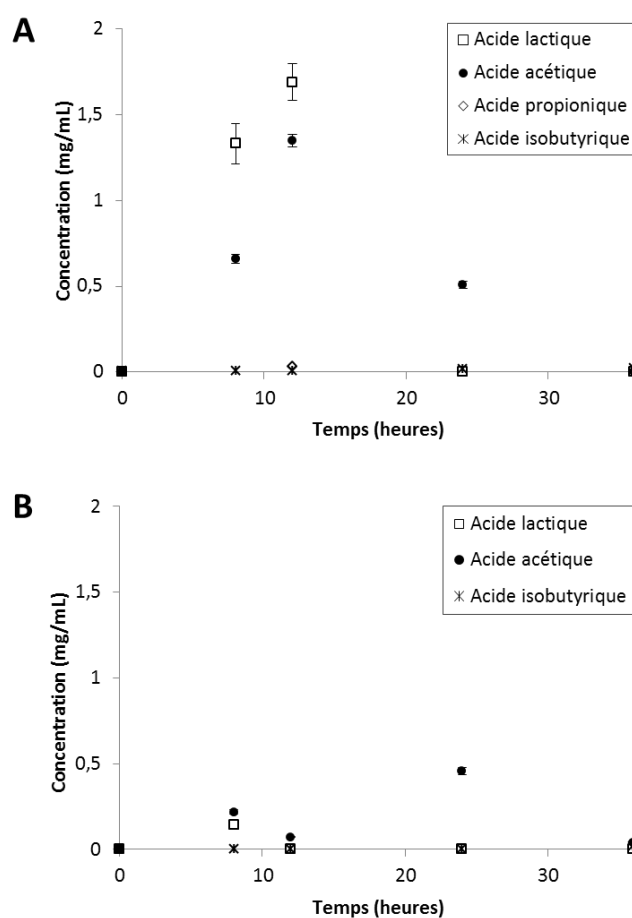


Figure 27: Concentrations en AGCCs et en acide lactique déterminées par chromatographie liquide dans le surnageant de culture de *B. subtilis* CU1. (A) substrat carboné glucose; (B) substrat carboné IMOS. Les résultats représentent la moyenne de trois expériences indépendantes \pm écart-type.

Au cours de la croissance de *B. subtilis* CU1 en présence de glucose comme unique source carbonée (Figure 27 A), des quantités importantes d'acides lactique et acétique sont produites dans le milieu (1,7 mg/mL et 1,35 mg/mL respectivement après 12 h de culture). Seules de faibles concentrations en acides propionique et isobutyrique sont détectables dans le surnageant de culture après 12 h, avec au maximum 0,03 et 0,02 mg/mL respectivement. Les concentrations des autres AGCCs dosés dans le surnageant de culture sont négligeables ou nulles, elles ne sont pas représentées sur le graphique.

En présence d'IMOS, seuls les acides lactique, acétique et isobutyrique ont été détectés dans le surnageant. Les autres AGCCs ne sont pas produits par la souche dans ces conditions. Les concentrations en acides lactique et acétique sont très faibles comparativement à celles observées en présence de glucose. En effet, après 8 h de culture, la concentration en acide acétique est trois fois moins importante pour la condition IMOS comparativement à la condition glucose. Dans les mêmes

conditions, la concentration en acide acétique est plus de dix fois inférieure à celle de l'acide lactique. A 12 h, les concentrations en acides acétique et lactique diminuent pour la condition IMOS, atteignant des valeurs proche de zéro. Après 24 h de culture, la concentration en acide acétique atteint 0,46 mg/mL, puis devient nulle après 36 h.

Au vu de ces résultats, l'acide lactique et l'acide acétique semblent être les deux acides organiques majoritairement produits par *B. subtilis* CU1. Cependant, l'utilisation des IMOS comme substrat se traduit par la réduction de la production de ces deux acides organiques. Rycroft et coll. (2001) avaient observé lors d'une analyse *in vitro* de la production d'AGCCs dans un échantillon de matières fécales provenant de donneurs sains, que les IMOS, comparativement à d'autres substrats prébiotiques comme l'inuline, les FOS ou les XOS, induisaient une plus faible production d'acides lactique et acétique, et aucune stimulation de la production d'acide propionique. Une étude *in vivo* réalisée sur des rats a montré que l'addition d'IMOS à la ration alimentaire des animaux réduit la concentration en AGCCs totaux, et plus particulièrement celle de l'acide acétique dans les matières fécales. Ces résultats ont été corrélés à l'augmentation du nombre de lactobacilles. Aucune modification des concentrations en acides propionique, isobutyrique, valérique et iso-valérique n'a été rapportée, supposant que l'utilisation des IMOS par les bactéries du tractus intestinal ne conduit pas à la formation de ces composés. Nous pouvons également émettre l'hypothèse que, en corrélation avec la modification de composition du microbiote observée par les auteurs, les IMOS pourraient avoir été dégradés avant l'arrivée dans le côlon. Les AGCCs auraient ainsi été absorbés dans l'intestin grêle (Ketabi *et al.* 2011).

6. Analyse du protéome de *B. subtilis* CU1 par électrophorèse bidimensionnelle (2D-PAGE)

Afin d'obtenir des éléments d'information sur les mécanismes mis en œuvre par *B. subtilis* CU1 pour l'utilisation des IMOS, et sur les potentiels effets physiologiques sur la souche, nous avons utilisé l'électrophorèse bidimensionnelle (2D-PAGE). Si le génome d'un organisme est statique ou presque, son protéome, est quant à lui dynamique, car toutes les protéines ne sont ni exprimées en même temps ni en même quantité. Plusieurs formes d'une protéine peuvent coexister en raison des modifications post-traductionnelles, et du fait que leur expression diffère selon l'état physiologique de la cellule et de son environnement. L'immense majorité des processus cellulaires étant assurée par des protéines, l'analyse protéomique a un rôle essentiel dans la compréhension des fonctions biologiques. Il s'agit par conséquent d'un outil particulièrement adapté à la caractérisation moléculaire du potentiel probiotique (Hamon 2011).

Les cellules de *B. subtilis* CU1 cultivées soit en présence de glucose, soit en présence d'IMOS comme unique substrat carboné, sont récupérées en fin de phase exponentielle et les protéines totales ont été extraites. Le mélange protéique a été séparé par électrophorèse 2D.

Certains spots ne sont pas pris en compte pour l'analyse car ils ne sont pas présents dans chacun des répliquats de gels, ou bien présentent une variabilité importante. Seuls les spots protéiques systématiquement présents dans au moins trois des gels sur les quatre répliquats sont pris en compte dans l'analyse. Parmi ces spots, seuls ceux présentant une différence d'intensité moyenne supérieure à 1,3 entre les deux conditions (avec $p < 0,06$ en appliquant la loi de « Student »), sont considérés comme contenant des protéines exprimées de façon différente. En utilisant cette analyse statistique, 69 spots sont identifiés en tant que « variants » selon les conditions de culture (Figure 28). Les variants sont analysés par cartographie peptidique massique¹ afin de les identifier.

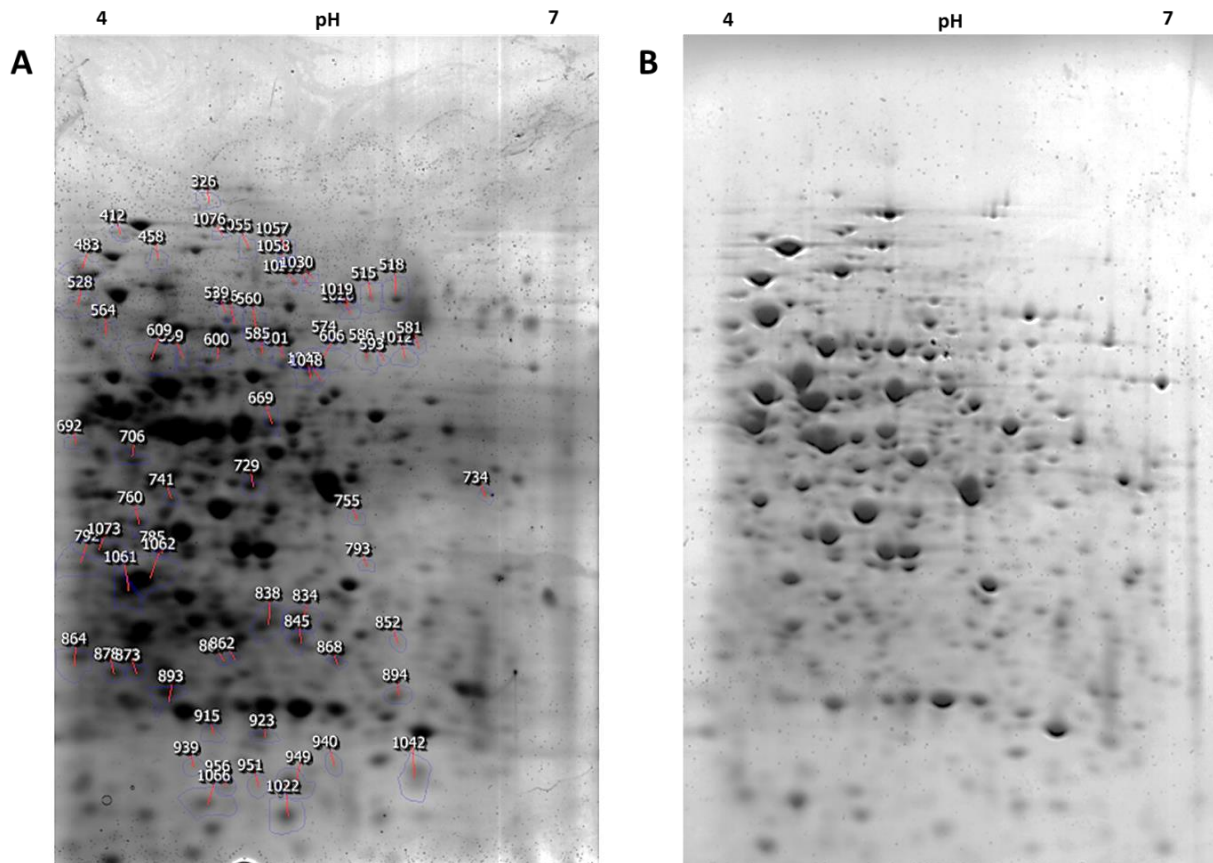


Figure 28: Profil du protéome de *B. subtilis* CU1 par 2D-PAGE après croissance sur glucose (A) ou IMOS (B). Gel 10% acrylamide, pH 4-7, coloration au bleu colloïdal G-250. Identification des variants analysés par un numéro sur le gel A.

¹ Peptide Mass Fingerprinting (PMF)

Les protéines identifiées sont résumées dans le Tableau 20, et les résultats d'analyse des spots sont présentés en annexes.

Protéines identifiées	Numéros d'accès	Symbole du gène	Spots	Intensité
Synthèse des acides aminés et des protéines				
Serine hydroxymethyltransferase	P39148	<i>glyA</i>	949	-4,1
			734	-2,3
Elongation factor G	P80868	<i>fusA</i>	412	-3,3
			692	-2,1
			792	-1,5
			1022	-3,3
Elongation factor Tu	P33166	<i>tuf</i>	692	-2,1
			792	-1,5
			1062	-1,4
Aspartyl/glutamyl-tRNA(Asn/Gln) amidotransferase subunit B	O30509	<i>gatB</i>	600	1,7
Chaperone protein DnaK	P17820	<i>dnaK</i>	483	-1,7
			692	-2,1
			1062	-1,4
Glycine--tRNA ligase beta subunit	P54381	<i>glyS</i>	1019	2,7
Methionine--tRNA ligase	P37465	<i>metG</i>	1076	2,1
Phenylalanine--tRNA ligase beta subunit	P17922	<i>pheT</i>	326	1,9
Leucine--tRNA ligase	P36430	<i>leuS</i>	326	1,9
Serine hydroxymethyltransferase	P39148	<i>glyA</i>	734	-2,3
Threonine synthase	P04990	<i>thrC</i>	729	-1,5
Production et conversion énergétique				
Cytidylate kinase	P38493	<i>cmk</i>	867	2,2
Acetyl-coenzyme A synthetase	P39062	<i>acsA</i>	1020	2,2
			1019	2,7
ATP synthase subunit beta	P37809	<i>atpD</i>	878	-2,1
			873	-1,5
ATP synthase subunit alpha	P37808	<i>atpA</i>	729	-1,5
Glycine betaine/carnitine/choline transport ATP-binding protein	O34992	<i>opuCA</i>	923	-1,9
Métabolisme & transport des sucres				
Methylmalonate semialdehyde dehydrogenase	P42412	<i>iolA</i>	586	2,1
Alanine dehydrogenase	Q08352	<i>ald</i>	834	-2,4
			669	-2,2
			845	-1,5
			729	-1,5
Isocitrate dehydrogenase	P39126	<i>icd</i>	894	-2,9
			1062	-1,4
Maltose-6-phosphate glucosidase	P54716	<i>glvA</i>	599	2,3
			600	1,7
			609	2,2

(Suite)				
Probable 6-phospho-beta-glucosidase	P46320	<i>licH</i>	1047	2
			1048	1,7
			867	2,2
UDP-glucose 4-epimerase	P55180	<i>galE</i>	741	1,5
Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	P08065	<i>sdhA</i>	518	1,5
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	P09124	<i>gapA</i>	1042	-2
			939	-1,8
Phosphoglucomutase	P18159	<i>pgcA</i>	458	1,4
Probable fructose-bisphosphate aldolase	P13243	<i>fbaA</i>	834	-2,4
			845	-1,5
Malate dehydrogenase	P49814	<i>mdh</i>	1073	-1,6
			760	-1,8
Phosphoglycerate kinase	P40924	<i>pgk</i>	706	-1,6
L-lactate dehydrogenase	P13714	<i>ldh</i>	729	-1,5
Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase	P08838	<i>ptsI</i>	1073	-1,6
Synthèse de la paroi				
UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate--2,6-diaminopimelate ligase	Q03523	<i>murE</i>	1012	2,1
			1062	-1,4
Spore coat-associated protein N	P54507	<i>tasA</i>	1062	-1,4
Synthèse d'antibiotiques				
Polyketide biosynthesis 3-hydroxy-3-methylglutaryl-ACP synthase	P40830	<i>pksG</i>	1047	2
			601	1,6
Autres fonctions				
Pyridoxal biosynthesis lyase	P37527	<i>pdxS</i>	923	-1,9
			915	-2
DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	P20429	<i>rpoA</i>	893	-1,4
Flagellin	P02968	<i>hag</i>	760	-1,8

Tableau 20: Protéines différemment exprimées chez *B. subtilis* CU1 entre la condition glucose et la condition IMOS. Les protéines identifiées sont classées par catégorie fonctionnelles. Les numéros d'accès correspondent à la banque UniProt, et les numéros de spots correspondent à ceux indiqués sur les gels Figure 28.

L'analyse du protéome de *Bacillus subtilis* CU1 a pour objectif de mettre en évidence les voies métaboliques mises en place consécutivement à l'utilisation des IMOS comme unique substrat carboné. Plusieurs protéines impliquées dans le métabolisme et le transport des sucres ont été identifiées par spectrométrie de masse et sont présentées dans le Tableau 21.

Protéines identifiées	Abréviations	Numéros d'accès	Symbole du gène	Spots	Références
Maltose-6-phosphate glucosidase	MalA/GlvA	P54716	<i>glvA</i>	599	Yip <i>et al.</i> 2007 Schönert <i>et al.</i> 2006
				600	
				609	
Probable 6-phospho-β-glucosidase	-	P46320	<i>licH</i>	1047	Tobish <i>et al.</i> 1997
				1048	
				867	
Methylmalonate semialdehyde dehydrogenase	-	P42412	<i>iolA</i>	586	-
Isocitrate dehydrogenase	CitC	P39126	<i>icd</i>	894	Petrovova <i>et al.</i> 2014
				1062	
UDP-glucose 4-epimerase	GalE	P55180	<i>galE</i>	741	Chai <i>et al.</i> 2002
Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	SdhA	P08065	<i>sdhA</i>	518	-
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	P09124	<i>gapA</i>	1042	Doan <i>et al.</i> 2003
				939	
Probable fructose-bisphosphate aldolase	FbaA	P13243	<i>fbaA</i>	834	Tunio <i>et al.</i> 2010
				845	
Malate dehydrogenase	Mdh	P49814	<i>mdh</i>	1073	Jin et Sonenshein 1994
				760	
Phosphoglycerate kinase	Pgk	P40924	<i>pgk</i>	706	Schmid <i>et al.</i> 1997
L-lactate dehydrogenase	LDH	P13714	<i>ldh</i>	729	Ramos <i>et al.</i> 2000
Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase	PtsI	P08838	<i>ptsI</i>	1073	Saier <i>et al.</i> 2012

Tableau 21: Protéines impliquées dans le métabolisme et le transport des IMOS chez *Bacillus subtilis* CU1. Comparaison de l'expression protéique entre la condition glucose et la condition IMOS.

La maltose-6-phosphate glucosidase (GlvA ou MalA) surexprimée en présence d'IMOS est une enzyme capable d'hydrolyser le maltose-6-phosphate lorsque ce dernier est accumulé dans la cellule par le système de phosphotransférase phosphoénolpyruvate maltose dépendant (PEP-PTS). Le système de transport actif PEP-PTS permet le passage des unités maltose de l'espace interstitiel vers le cytosol. Ce transport est couplé à leur phosphorylation (voir Figure 29).

Le maltose-6-phosphate est ensuite pris en charge par la GlvA pour être hydrolysé en glucose et glucose-6-phosphate, qui pourront être utilisés directement pour la glycolyse. Toutefois, une glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH), première enzyme de la voie des pentose-phosphate et surexprimée en présence d'IMOS, a été identifiée au cours d'une précédente analyse par électrophorèse monodimensionnelle. Ces observations laissent supposer qu'en présence d'IMOS, la production d'énergie nécessite l'obtention de pouvoir réducteur via la voie des pentoses phosphates. La GlvA est connue pour être induite en présence de maltose et réprimée en présence de glucose, ce qui est en accord avec nos observations. La présence de cette enzyme dans le catabolisme suggère que les IMOS doivent au préalable être hydrolysés en maltose (dimères de glucose liés en $\alpha(1\rightarrow4)$) dans le milieu extracellulaire.

Ces observations sont en accord avec la mise en évidence d'une activité α -glucosidase dans le milieu de culture (section 4). Cependant, aucune protéine sécrétée, de type α -glucosidase, n'a été identifiée au cours de l'analyse protéomique par 2D-PAGE. Schönert et coll. (2006) ont mis en évidence, chez *Bacillus subtilis* 168, la présence d'une alpha amylase extracellulaire (AmyE) responsable de l'endohydrolyse des liaisons glycosidiques $\alpha(1\rightarrow4)$ présentes dans la structure de l'amidon. Or la présence de maltose dans le milieu de culture de *Bacillus subtilis* CU1 nécessite une hydrolyse des liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$ dans la structure des IMOS. Dans ce cas, soit l'enzyme AmyE hydrolyse également les liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$, soit les oligosaccharides obtenus après hydrolyse des liaisons $\alpha(1\rightarrow4)$ sont pris en charge par un autre système de transport, tel que le type ABC (Schönert *et al.* 2006), mais aucun des variants que nous avons identifiés ne permet de valider cette hypothèse.

Toutefois, il existe une oligo- $\alpha(1\rightarrow6)$ -glucosidase (MalL) synthétisée par *Bacillus subtilis*, et capable d'hydrolyser les liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$ de disaccharides et de glucides possédant un DP supérieur à 2. Cette enzyme a été identifiée au cours d'une précédente analyse par électrophorèse 1D, mais n'a pas été mise en évidence par électrophorèse 2D (66039 Da ; pI 5,15). Nous supposons que cette enzyme correspond à l' α -glucosidase dont l'activité a été révélée dans le surnageant de culture. Elle serait à l'origine de l'hydrolyse des IMOS en maltose, avant leur transport vers le cytosol de la bactérie.

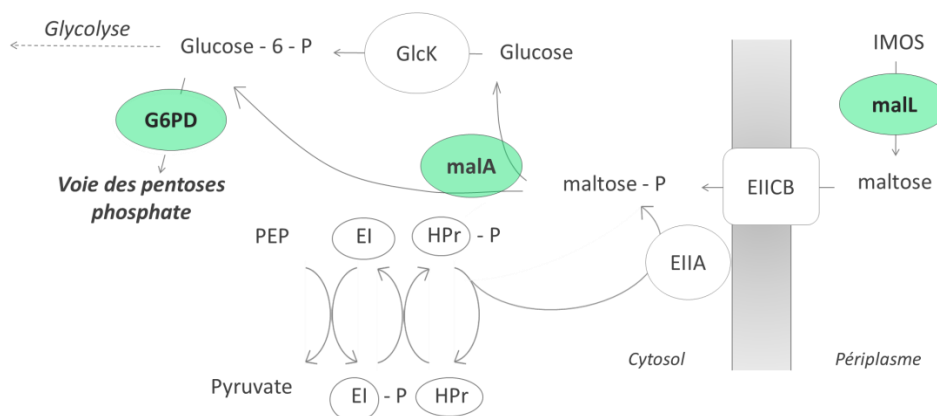


Figure 29: Voie hypothétique d'utilisation des IMOS par *B. subtilis* CU1. MalL : oligo- $\alpha(1\rightarrow6)$ -glucosidase ; GlvA : maltose-6-phosphate glucosidase ; G6PDH : glucose-6-phosphate déshydrogénase.

La présence d'une 6-phospho- β -glucosidase identifiée à plusieurs reprises dans des spots différents est difficile à justifier. En effet, aucune liaison glycosidique de type β n'a été observée dans la structure des IMOS par spectrométrie de masse, et l'utilisation de cette enzyme dans l'assimilation du substrat prébiotique n'a pas été mise en évidence.

L'UDP-glucose 4-épipérase (GalE) est une enzyme du métabolisme du galactose qui catalyse la conversion réversible de l'UDP-galactose en UDP-glucose, couplée à la réduction du NAD. L'UDP glucose et l'UDP-galactose sont des nucléotides nécessaires dans la biosynthèse des exopolysaccharides (EPS) (Chai *et al.* 2012). De plus, chez *Bacillus subtilis*, GalE catalyse l'interconversion de l'UDP-GlcNac en UDP-GalNac (Soldo *et al.* 2003). Elle est surexprimée en présence d'IMOS, laissant supposer que ce prébiotique pourrait avoir un impact sur la synthèse des EPS. Des travaux ont montré que les EPS peuvent être impliqués dans l'adhésion de *Bifidobacterium longum* NB667 et *Bifidobacterium animalis* IPLA-R1 au mucus intestinal (Ruas-Madiedo *et al.* 2006). Il a été montré qu'une synthèse d'EPS peut contribuer à la résistance à la bile (Burns *et al.* 2010). Ainsi, nous pourrions émettre l'hypothèse que les IMOS pourraient favoriser une tolérance de *Bacillus subtilis* CU1 aux conditions retrouvées au niveau du tractus intestinal, mais également augmenter son temps de séjour.

L'expression de l'isocitrate déshydrogénase (CitC), enzyme impliquée dans ce cycle de Krebs, est diminuée en présence d'IMOS. Chez les bactéries, la répression de cette enzyme est assurée par une isocitrate déshydrogénase kinase qui inactive l'enzyme par phosphorylation lorsque la quantité d'ATP dans la cellule est suffisante. Il semblerait qu'un second site de régulation, cette fois-ci au niveau de la transcription ou de la traduction, puisse être mis en place par la bactérie pour contrôler les

niveaux d'ATP dans la cellule. Cette observation permet de supposer que le rendement énergétique avec les IMOS est plus important qu'avec le glucose comme unique substrat carboné.

La succinate déshydrogénase (SdhA) et la malate déshydrogénase (Mdh) sont deux enzymes intervenant dans le cycle de Krebs. En présence d'IMOS, une surexpression de la SdhA permet le transfert des électrons provenant du succinate vers la chaîne respiratoire, augmentant ainsi la production d'énergie sous forme d'ATP. L'enzyme Mdh, qui permet la transformation du malate en oxaloacétate, est quant à elle réprimée.

La glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GapA ou GAPDH) est surexprimée en présence d'IMOS. Il s'agit d'une kinase clé de la glycolyse, qui permet la conversion réversible du glyceraldéhyde-3-phosphate en glyceraldéhyde-1,3-bisphosphate (Doan et Aymerich 2003) pour la production de pyruvate. La réaction catalysée par cette enzyme est également à l'origine de la production de pouvoir réducteur (NADH). Sa surexpression est en accord avec la précédente hypothèse selon laquelle les IMOS augmenteraient les rendements en ATP comparativement au substrat glucose. Cette enzyme est surexprimée en présence de bile (Burns *et al.* 2010), suggérant qu'elle favoriserait l'obtention de plus hauts rendements en ATP permettant la mise en place de mécanismes de détoxification énergie-dépendant.

En revanche, deux autres enzymes de la glycolyse, une phosphoglycérate kinase (Pfk) et une probable fructose-bisphosphate aldolase (FbaA), sont sous-exprimées en présence d'IMOS. La fbaA catalyse une réaction réversible d'aldolisation du glyceraldéhyde-3-phosphate en fructose 1,6-bisphosphate. Chez *Neisseria meningitidis*, bactérie responsable de septicémies et de méningites, la FbaA est un facteur de virulence, qui joue un rôle dans l'adhésion aux cellules épithéliales (Tunio *et al.* 2010). Il est possible que chez *Bacillus subtilis* CU1, cette enzyme puisse intervenir dans l'adhésion aux cellules de l'intestin.

La formation de lactate par *Bacillus subtilis* est dépendante de la présence d'une lactate déshydrogénase (LDH), qui produit le lactate à partir de pyruvate au cours de la fermentation. En présence d'IMOS, l'expression de la LDH est réprimée ce qui explique la diminution de la production d'acide lactique dans le milieu observée précédemment (Ramos *et al.* 2000).

La phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase (PtsI) est impliquée dans le transport des sucres entre le milieu extracellulaire et le cytosol. Elle permet le transfert d'un groupement phosphate du phosphoenolpyruvate vers l'ose entrant via une « heat-stable histidine-containing protein » (HPr). Sa sous-expression suppose que le taux de phosphorylation du substrat est réprimé en présence d'IMOS (Saier et Shlykov 2012).

L'ensemble des protéines identifiées dans le métabolisme intracellulaire des IMOS est résumé dans la Figure 30.

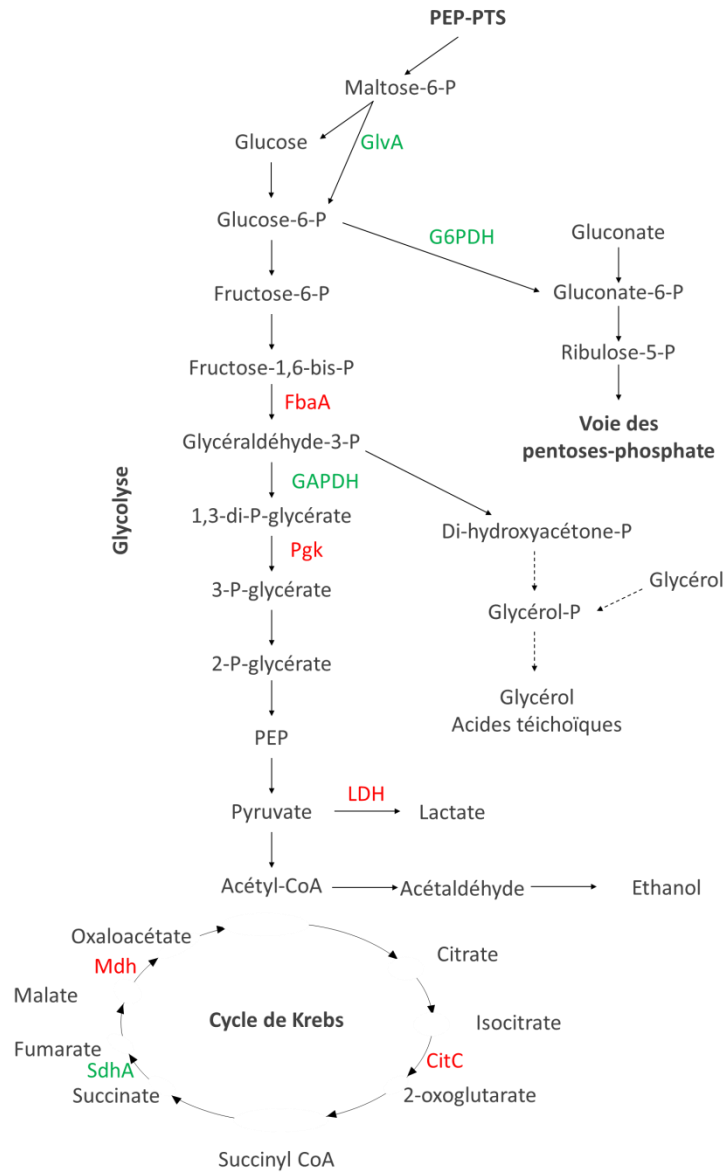


Figure 30: Représentation schématique des voies de la glycolyse et du cycle de Krebs chez *Bacillus subtilis*.
Les enzymes identifiées comme surexprimées en présence d'IMOS sont indiquées en vert, les sous-exprimées sont indiquées en rouge.

Ces résultats préliminaires nous ont permis de mettre en évidence la voie principale de transport et de catabolisme des IMOS. L'utilisation préférentielle de la voie de la glycolyse ou de la voie des pentoses-phosphate dépend néanmoins des besoins de la bactérie en ATP et en NADH. En présence d'IMOS, l'orientation de la voie métabolique pourrait permettre de favoriser la résistance du probiotique à la bile. L'utilisation des IMOS pourrait également favoriser ou réprimer l'expression de

certaines facteurs d'intérêt probiotique, impliqués dans l'adhésion ou l'immunomodulation par exemple. Dans la suite du travail, l'effet du prébiotique IMOS sur la capacité d'adhésion de la souche *Bacillus subtilis* CU1 aux cellules épithéliales intestinales va être étudié *in vitro*.

7. Adhésion de *B. subtilis* CU1 aux cellules épithéliales intestinales

L'adhésion aux surfaces intestinales est considérée comme une caractéristique importante pour une souche probiotique, cette capacité lui permettant potentiellement d'exercer des effets bénéfiques (Araya *et al.* 2002). La capacité d'adhésion des bactéries aux surfaces intestinales seraient notamment dépendante de l'existence de certaines protéines de surface, comme des lectines spécifiques du mannose ou les protéines de la couche S, qui se lient à des récepteurs spécifiques de la muqueuse intestinale (Tallon *et al.* 2007). Chez le genre *Bacillus*, très peu de protéines impliquées dans l'adhésion ont été identifiées (Vélez *et al.* 2007; Sánchez *et al.* 2009). Les résultats que nous avons obtenus précédemment suggèrent que la croissance de *B. subtilis* CU1 sur un substrat carboné IMOS se traduit par des modifications qualitatives et quantitatives aux niveaux de sa surface et de son sécrétome, qui sont susceptibles d'avoir une incidence sur la capacité d'adhésion de la bactérie probiotique.

Dans cette section nous avons cherché à mettre en évidence *in vitro* un effet possible des IMOS sur la capacité d'adhésion de *B. subtilis* CU1 aux cellules épithéliales intestinales. Pour cela, la souche a été cultivée sur glucose ou IMOS comme unique substrat carboné. Les cellules ont été prélevées à différents temps de culture (8 h, 12 h, 24 h et 36 h), et incubées à raison de 10^5 UFC/mL sur un tapis de cellules confluentes de la lignée Caco-2 (Sánchez *et al.* 2009). Après 1 h d'incubation, les cellules Caco-2 sont lavées et le nombre d'UFC ayant adhérees aux cellules est déterminé par dénombrement sur gélose. Le pourcentage d'adhésion est déterminé en faisant le rapport entre le nombre d'UFC adhérentes et le nombre d'UFC déposées sur les cellules (Figure 31).

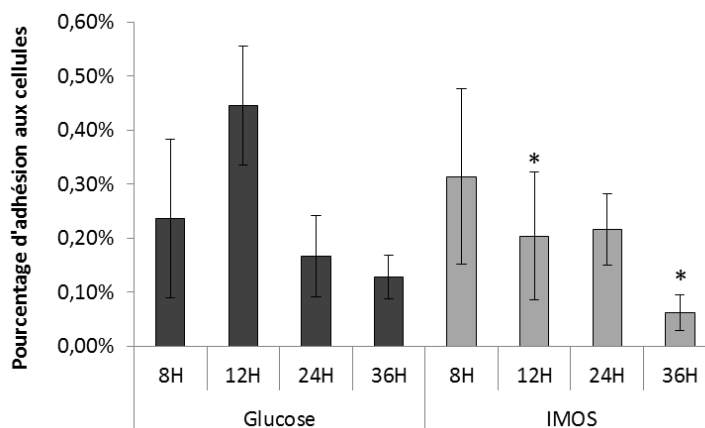


Figure 31: Pourcentage d'adhésion de *B. subtilis* CU1 sur cellules Caco-2. Après 8, 12, 24, et 36 h de croissance sur substrat glucose ou IMOS, les cellules de *B. subtilis* CU1 sont lavées et incubées pendant 1 h avec les cellules Caco-2 confluentes. Après lavage, le nombre d'UFC adhérentes est déterminé par dénombrement sur gélose. Les résultats représentent la moyenne de trois essais indépendants \pm écart-type ; * $p < 0,05$ comparativement à la condition glucose.

Les résultats obtenus montrent que l'adhésion de la souche est plus importante durant la phase exponentielle (8 h et 12 h) qu'en phase de déclin (36 h). Ces résultats s'expliquent par le fait qu'en phase de déclin, et en absence de sporulation, le phénomène de mort cellulaire est initié. Même si les bactéries ont adhéré aux cellules, elles ne se développent pas sur gélose. L'analyse statistique met en évidence une différence significative (avec $p < 0,05$) entre les deux conditions glucose et IMOS après 12 h et 36 h de croissance sur le substrat prébiotique, et non pour 8 h et 24 h. Cependant, les écarts-type importants, témoins de la trop faible reproductibilité de la méthode, ne nous permettent pas d'affirmer quant à un effet du substrat sur l'adhésion du probiotique aux cellules. En effet, de nombreuses étapes successives sont limitantes : dépôt d'un même nombre de bactéries dans les deux conditions, lavage des cellules, décollement des bactéries au triton X-100, dénombrement des bactéries viables sur gélose. Nous ne pouvons pas conclure quant au rôle des IMOS sur la capacité d'adhésion *in vitro* de la souche *B. subtilis* CU1.

8. Tolérance à la bile de *B. subtilis* CU1

La résistance à la bile est une caractéristique importante pour la sélection d'une souche probiotique. La bile est très toxique pour les bactéries qui ne sont pas adaptées à la vie dans le tractus gastro-intestinal. Des hydrolases de sels biliaires sont produites par de nombreuses espèces bactériennes, capables de survivre dans le tractus digestif. Ces hydrolases permettent la déconjugaison des sels biliaires (acide taurocholique et glycocholique) qui constituent une partie de la bile sécrétée.

La bile se compose de cholestérol, de phospholipides, de sels biliaires (à une concentration comprise entre 2% (p/v) et 0,05% (p/v) dans l'intestin), de pigments et d'eau (Hofmann et Hagey 2008). Elle est sécrétée dans le duodénum et réabsorbée par les vaisseaux sanguins de l'iléon. Dans la perspective d'une colonisation même transitoire de la muqueuse intestinale, il est nécessaire que les bactéries probiotiques puissent non seulement résister aux sels biliaires, mais également se développer en leur présence. Plusieurs souches probiotiques possédant une activité hydrolytique vis-à-vis des sels biliaires ont été identifiées et caractérisées. La tolérance aux sels biliaires de certains microorganismes peut-être attribuable à la présence d'hydrolases capables de dégrader ces derniers, et de protéines de transport, qui sont fonctionnellement reliées les unes aux autres, afin de répondre de efficacement au stress induit par les sels biliaires (Patel *et al.* 2010). Dans cette section, l'effet du substrat IMOS sur la tolérance à la bile de la souche *B. subtilis* CU1 a été étudié *in vitro*.

8.1. Tolérance des cellules végétatives à la bile

La tolérance à la bile a tout d'abord été évaluée en incubant les cellules végétatives de *B. subtilis* CU1 en milieu minimum avec du glucose ou des IMOS comme unique source carbonée, et en présence de 0,5% (p/v) ou 1% (p/v) de bile. Les précultures, récupérées en fin de phase exponentielle, ont été réalisées sur glucose ou IMOS, dans les mêmes conditions que les cultures, mais en absence de bile. Les cinétiques de croissance et la viabilité de la souche suivies pendant 48 h sont établies par mesure d'absorbance à 595 nm en plaque 48 puits et dénombrement sur gélose respectivement. Les concentrations en bile de 0,5% ou 1% correspondent à celles décrites dans la littérature comme présentes dans le duodénum. Ces concentrations sont cependant supérieures aux concentrations généralement choisies (0,3%) pour évaluer la tolérance à la bile de souches probiotiques (Cenci *et al.* 2006). Les cinétiques de croissance sont présentées Figure 32.

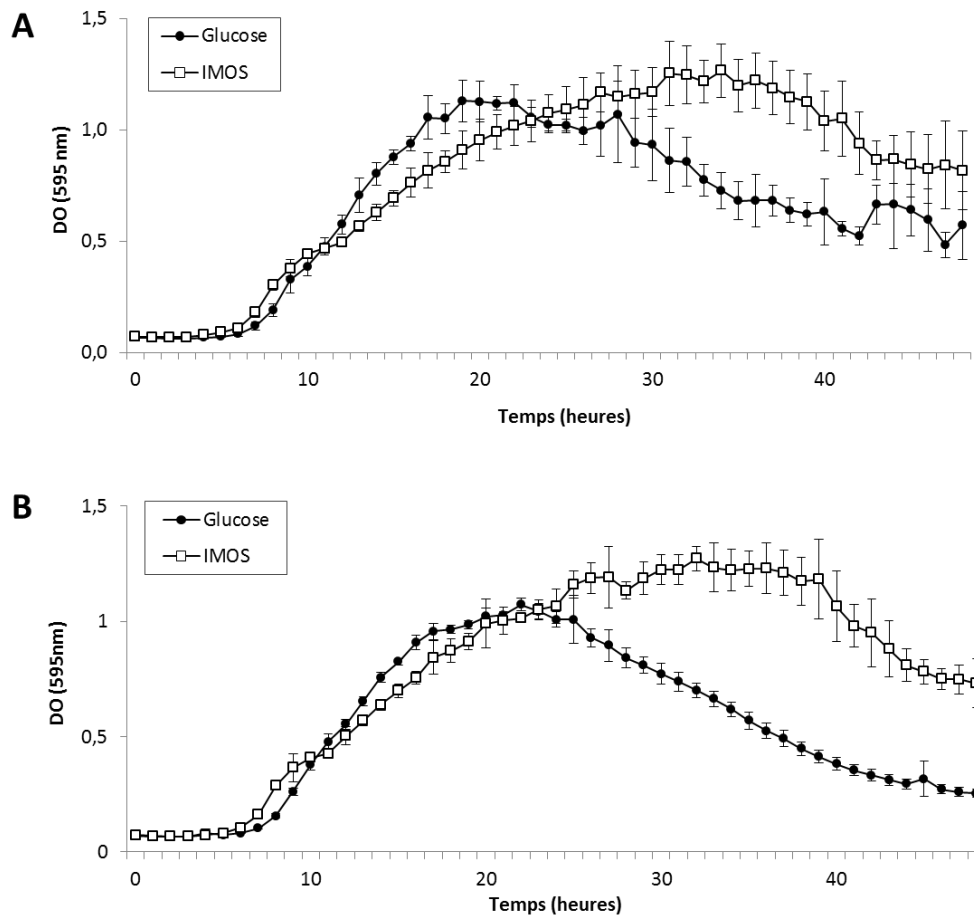


Figure 32: Représentation des cinétiques de croissance de la souche *B. subtilis* CU1 en milieu minimum avec glucose ou IMOS comme unique source carbonée et en présence de 0,5% (A) et 1% (B) de bile. Le milieu a été encencementé par 10^6 cellules végétatives/mL et incubé en plaque 48 puits à $37^{\circ}\text{C}/48$ h. La lecture de DO est réalisée à 595 nm toutes les heures. Les résultats représentent les absorbances moyennes dans 4 puits \pm écart type.

Les cinétiques de croissance établies précédemment en absence de bile indiquaient que la durée de la phase de latence est légèrement inférieure avec un substrat glucose, en comparaison au substrat IMOS (Figure 22). De plus, le temps de génération calculé à partir des courbes est plus faible lors de la croissance sur glucose.

Les résultats illustrés Figure 32 (A et B) montrent que quelle que soit la source carbonée, glucose ou IMOS, la souche *B. subtilis* CU1 est capable de croître en milieu minimum, en présence de 0.5% et 1% de bile. Le profil des courbes de croissance avec les IMOS met en évidence un épaulement vers 12 h, qui témoigne d'un phénomène de dioxie. Ce phénomène se manifestait peut-être en absence de bile, mais l'allure des courbes de croissance et les écarts-types importants sont susceptibles de l'avoir masqué (Figure 22). En absence de bile, la souche *B. subtilis* CU1 forme des agrégats, malgré l'agitation des cultures, limitant la précision des mesures de DO. Il est possible que la présence de sels

biliaires dans le milieu limite l'agrégation de la souche, conduisant par conséquent à des mesures de DO plus fiables et représentatives.

De plus, il apparaît qu'en présence de bile, la phase de latence sur un substrat IMOS soit significativement plus faible que sur un substrat glucose. Cette réduction de la phase de latence est particulièrement observable dans la condition à 0,5% de bile, où le temps de latence est d'environ 5,5 h avec les IMOS et de 7 h avec le glucose comme substrat carboné. Cet écart est plus réduit avec la condition à 1% de bile. Néanmoins, le taux de croissance avec la condition IMOS reste inférieur à celui noté de la condition glucose, et l'atteinte de la phase stationnaire nécessite un temps plus long (20 h avec glucose contre 30 h avec IMOS). La phase de déclin, qui pourrait constituer également la phase de resporulation chez *Bacillus*, apparaît précocement dans le cas de la condition glucose, ce qui est en accord avec le fait que la source carbonée glucose soit consommée plus rapidement que les IMOS. Pour cette raison, nous envisageons de contrôler le taux de sporulation de la souche au cours de sa croissance.

Bien que les IMOS soient un mélange complexe d'oligosaccharides, et que le taux de croissance de *B. subtilis* CU1 avec ce substrat soit légèrement inférieur à celui observé avec le glucose, ces résultats tendent à prouver que l'initiation de la croissance de la souche est favorisée avec le substrat prébiotique *in vitro*.

Le suivi de croissance en présence de bile ne peut être limité à des mesures de DO au cours du temps. Le fait de travailler sur des échantillons biologiques et plus particulièrement des bactéries nécessite d'utiliser plusieurs méthodes afin d'éviter une mauvaise interprétation. Pour cette raison, le nombre d'UFC/mL a été déterminé par dénombrement sur gélose après 12 h, 24 h, 36 h et 48 h de croissance avec glucose ou les IMOS comme unique substrat carboné (Figure 33).

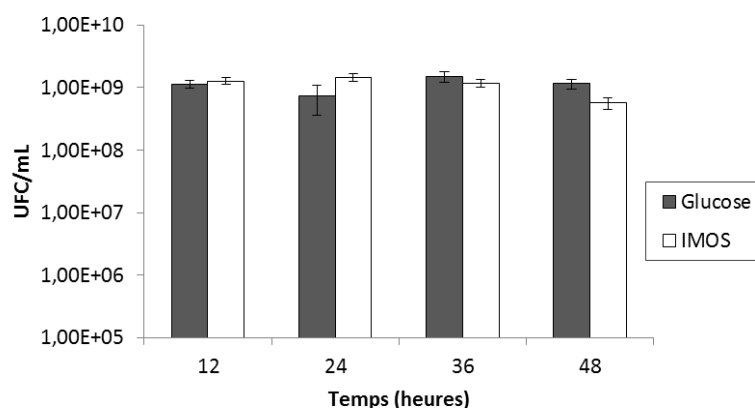


Figure 33: Effet de 0,5% de bile sur la croissance de *B. subtilis* CU1 en plaque 48 puits avec glucose ou IMOS comme unique substrat carboné. Les résultats obtenus représentent la moyenne \pm écart type de trois expériences indépendantes de dénombrements sur gélose.

La numération bactérienne en présence de 0,5% de bile ne révèle pas de différences significatives entre le nombre de bactéries sur substrat glucose et sur IMOS, quel que soit le temps de croissance. Après 12 h de culture, la DO mesurée est d'environ 0,5, aussi bien pour la condition glucose que IMOS, alors qu'elle est supérieure à 1 après 24 h. Or, ces résultats ne sont pas corrélables à la numération bactérienne : le nombre d'UFC/mL à 12 h est identique à celui obtenu à 24 h. A 36 h et 48 h de culture, temps pour lesquels l'écart de DO entre la condition glucose et la condition IMOS est importante, et en faveur de ces derniers, le dénombrement sur gélose indique la tendance inverse. De telles divergences de résultats entre les méthodes de suivi de la croissance peuvent être attribuables à la sporulation de la souche, importante en phase de déclin. Si ces cellules végétatives continuent leur croissance aisément sur milieu solide, la germination des spores dépend quant à elle fortement des conditions environnementales. Il est possible qu'après 36 h ou 48 h, le même nombre d'UFC/mL soit déterminé, quel que soit le substrat, si les spores produites sont repassées sous forme végétative.

8.2. Tolérance des spores à la bile

Lorsque le produit commercial Probisis[®] est ingéré, les cellules de *B. subtilis* sont sous forme de spores, et plusieurs études démontrent le passage sous forme végétative de *Bacillus* lorsque les conditions sont propices, ce qui favoriserait les effets bénéfiques sur l'hôte. Nous avons dans cette section, souhaité vérifier qu'en présence de bile, les spores de *B. subtilis* CU1 étaient capables de repasser sous forme végétative et de se multiplier comme cela a déjà été décrit par Casula et Cutting (2002). Les spores sont obtenues par chauffage d'une suspension de cellules végétatives à 70°C pendant 20 min. Les spores ont été incubées en plaque 48 puits à raison de 10⁶ UFC/mL en milieu

minimum, avec le glucose ou les IMOS comme unique source carbonée, et en présence de 0,5% et 1% de bile. Comme pour les cellules végétatives, la germination et la croissance des spores ont été suivies par mesure de DO à 595 nm (Figure 34).

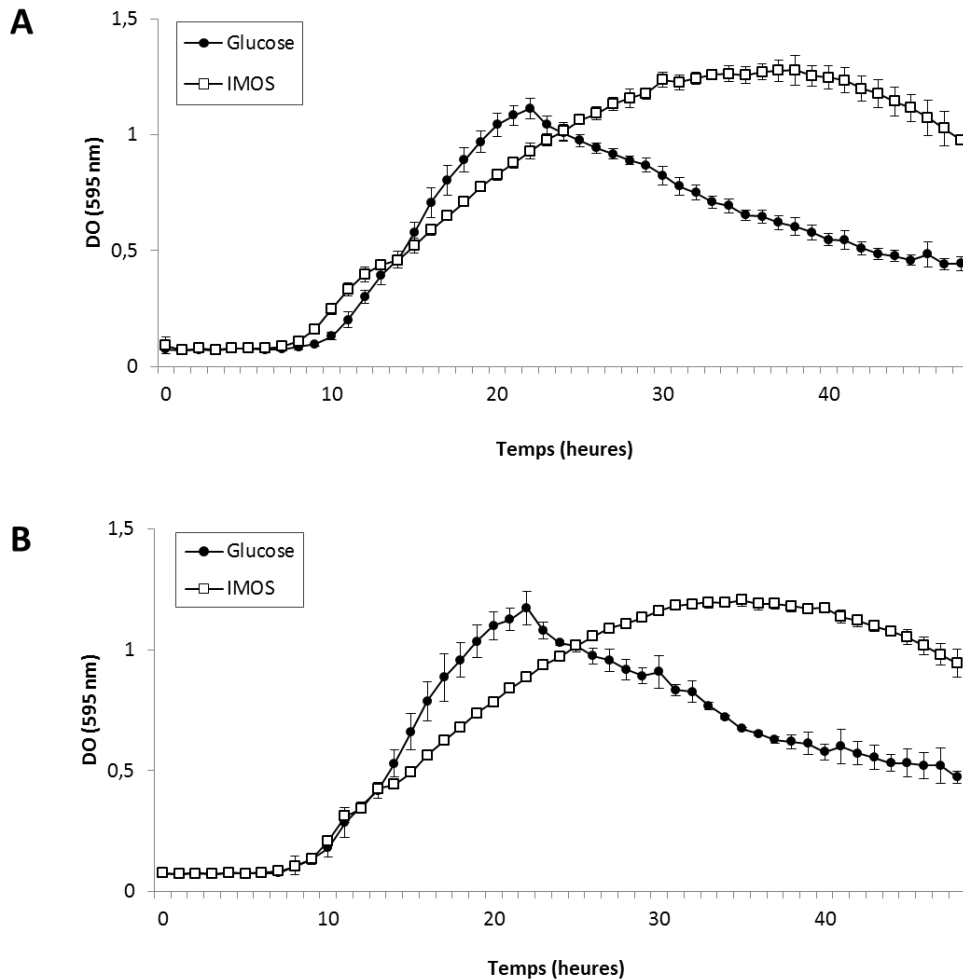


Figure 34: Représentation des cinétiques de croissance de la souche *B. subtilis* CU1 en milieu minimum avec glucose ou IMOS comme unique source carbonée et en présence de 0,5% (A) et 1% (B) de bile. Le milieu a été ensemencé par 10^6 spores/mL et incubé en plaque 48 puits à 37°C / 48 h. La lecture de DO est réalisée à 595 nm toutes les heures. Les résultats représentent les absorbances moyennes dans 4 puits \pm écart type.

Les courbes de croissance obtenues à partir des spores de *B. subtilis* CU1 présentent un profil semblable à celle obtenues avec les cellules végétatives (Figure 32), que le milieu contienne 0,5% (Figure 34 A) ou 1% (Figure 34 B) de bile. La principale différence notable concerne la durée de la phase de latence. Celle-ci est plus longue lorsque le milieu est ensemencé avec les spores (10 h contre 7 h avec les cellules végétatives), ce qui est attribuable au fait que les cellules sporulées doivent dans un premier temps repasser sous forme végétative.

Comme cela a été observé dans la section 8.1, en présence d'IMOS, la durée de la phase de latence en présence de 0,5% de bile (Figure 34 A) est significativement réduite comparativement à la condition avec glucose. Cette réduction n'est pas observable dans l'expérience avec 1% de bile dans le milieu (Figure 34 B). Concernant la phase exponentielle de croissance et la phase de déclin, les mesures de croissance à partir de spores sont comparables à celles obtenues à partir de cellules végétatives.

Ces résultats montrent qu'en présence de bile, un substrat carboné tel que les IMOS pourrait favoriser la germination des spores, de façon plus efficace que ne le fait un substrat glucose. Si l'on fait l'hypothèse qu'un tel avantage des IMOS peut être transposable *in vivo* au niveau du tractus intestinal, alors l'association du probiotique sous forme de spores avec un substrat prébiotique IMOS, faiblement absorbé dans l'intestin, pourrait permettre d'augmenter l'apport en source carbonée disponible pour la souche. Les conditions deviendraient alors plus favorables à sa germination, notamment dans l'environnement intestinal en présence de bile, ce qui permettrait d'augmenter la capacité du probiotique à exercer des effets bénéfiques sur l'hôte. L'intérêt d'une association IMOS/*B. subtilis* CU1 est résumé sous forme de schéma dans la Figure 35 :

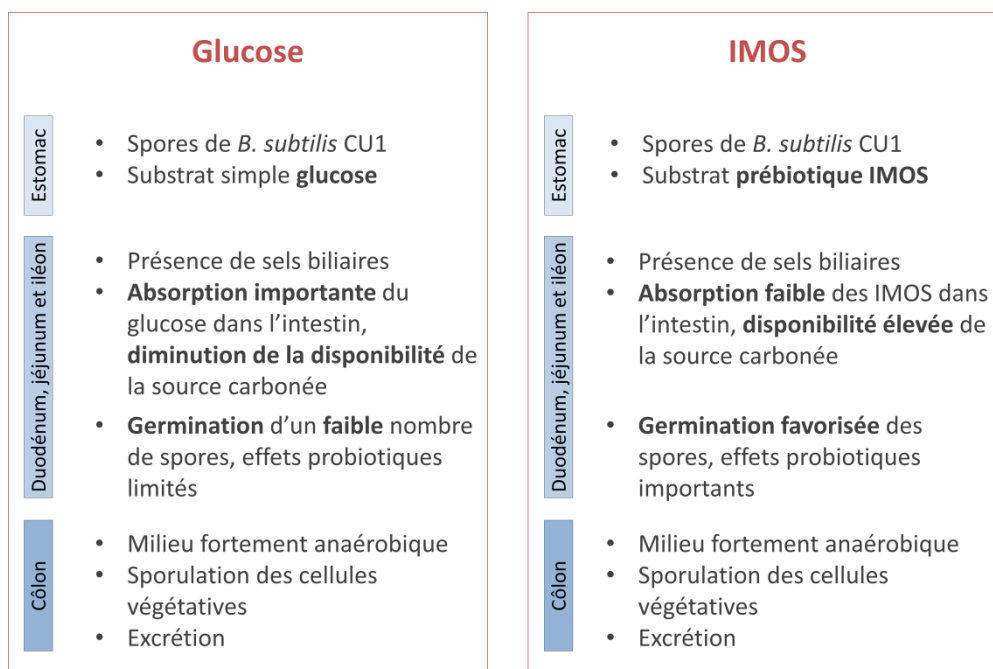


Figure 35: Intérêt potentiel de l'utilisation d'IMOS comme substrat prébiotique associé à l'ingestion du probiotique *B. subtilis* CU1.

8.3. Activité α -glucosidase et utilisation de la source carbonée lors de la croissance de *B. subtilis* CU1 en présence de bile

Afin d'obtenir des informations sur l'utilisation des IMOS par la souche en présence de bile, nous avons suivi l'évolution de la concentration du substrat carboné par chromatographie liquide sur colonne Aminopropyle. Les concentrations en glucose, maltose et isomaltose dans le surnageant de culture ont été suivies au cours de la croissance de *B. subtilis* CU1 en milieu minimum contenant 0,5% de bile et en présence d'IMOS comme unique substrat carboné (Figure 36). Dans ces mêmes conditions, l'activité α -glucosidase a été mesurée dans le surnageant de culture. Les résultats obtenus sont présentés Figure 37.

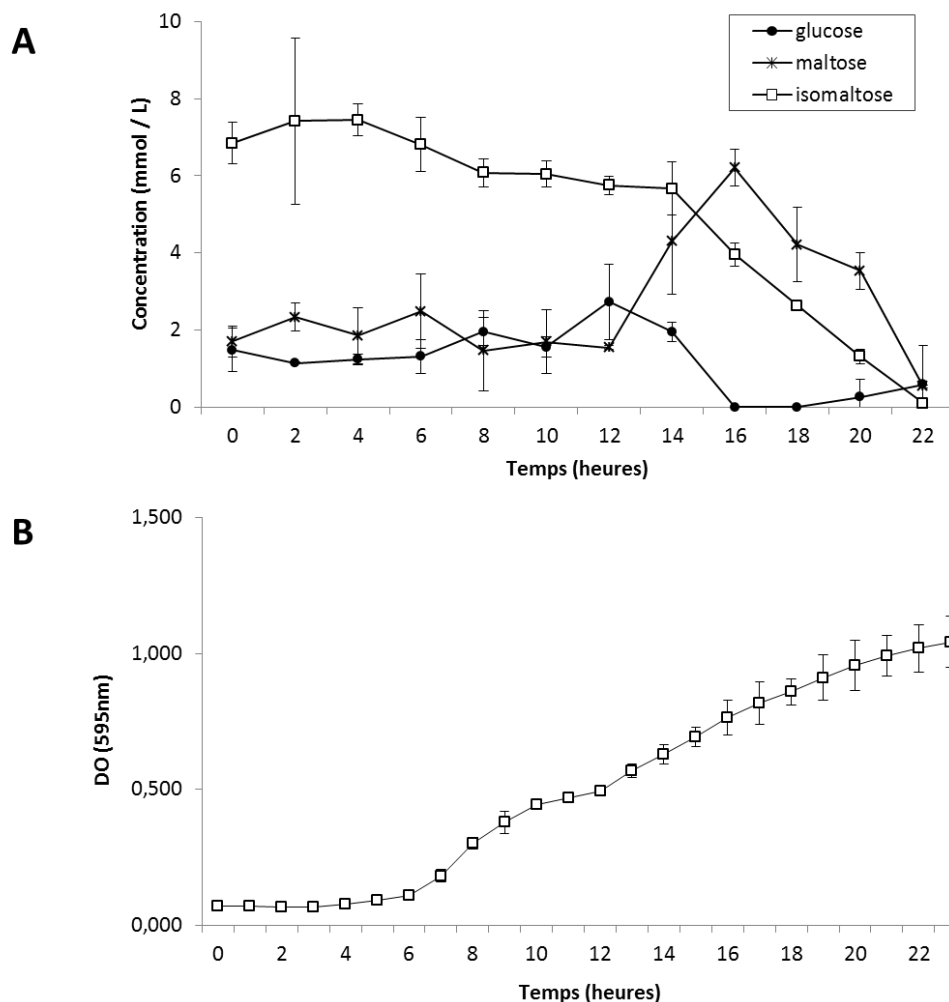


Figure 36: (A) Dosages du glucose, maltose et isomaltose sur colonne Aminopropyle au cours de la croissance de *B. subtilis* CU1 en présence de 0,5% de bile, avec les IMOS comme unique substrat carboné. Les résultats obtenus représentent la moyenne de trois expériences \pm écart type. (B) Rappel de la cinétique de croissance de *B. subtilis* CU1 en présence de 0,5% de bile, avec les IMOS comme unique substrat carboné.

La représentation graphique du dosage des oses est limitée à une durée de 22 h, car au-delà de ce temps de culture, plus aucun des glucides n'est détectable. Bien que préliminaires, ces résultats suggèrent qu'en présence de bile, le glucose présent en faible concentration est utilisé tardivement, après 14 h de culture. En revanche, la concentration en isomaltose diminue dès 6 h de culture, et de manière plus importante après 14 h. La concentration du maltose quant à elle augmente significativement à partir de 14 h de culture, puis diminue après 16 h ce qui laisse supposer que du maltose est produit par l'hydrolyse d'oligosaccharides de plus hauts DP.

Si l'on compare ces résultats à ceux obtenus en absence de bile dans la section 3.2 (Figure 36), on peut noter que les oses présents dans le milieu de culture ne sont pas métabolisés dans le même ordre par *B. subtilis* CU1. En effet, en présence de bile, le glucose ne semble plus être le substrat utilisé préférentiellement. L'isomaltose semble être consommé, en faible proportion, en premier par la souche. Durant la suite de la croissance bactérienne, il est utilisé en même temps que le glucose. Ces résultats supposent qu'une répression catabolique de l'utilisation des IMOS en présence de glucose pourrait être inhibée en présence de bile.

Parallèlement au suivi de la consommation des oses, l'activité α -glucosidase a été déterminée dans le surnageant de *B. subtilis* CU1 dans les mêmes conditions durant 48 h (Figure 37).

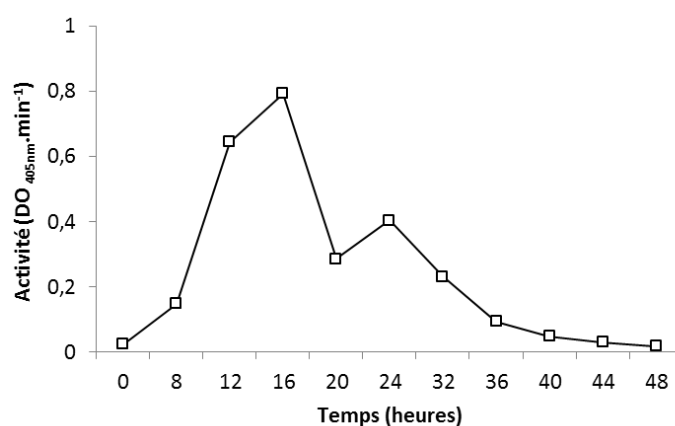


Figure 37: Suivi cinétique de la production d'activité α -glucosidase dans le surnageant de culture de *B. subtilis* CU1 en présence de bile. Croissance en milieu minimum supplémenté avec 1% d'IMOS (p/v) en présence de 0,5% (p/v) de bile. Les résultats présentés sont les moyennes de deux expériences indépendantes.

L'activité α -glucosidase augmente dès le début de la croissance bactérienne dans le surnageant de culture de *B. subtilis* CU1 avec les IMOS comme substrat carboné, et en présence de bile. Or, en absence de bile, nous avons vu précédemment que cette activité n'augmentait qu'après 10 h de culture (paragraphe 4.2, Figure 26). Ces résultats semblent confirmer l'hypothèse proposée précédemment,

selon laquelle, en présence de bile, la répression catabolique favorisant le catabolisme du glucose dans un premier temps serait inhibée, au profit de l'utilisation des IMOS (et notamment de l'isomaltose).

La même expérience a été réalisée avec un mélange glucose/IMOS comme source carbonée, afin de vérifier si, en présence d'une concentration importante en glucose, ces résultats étaient confirmés. Les résultats obtenus pour le dosage des glucides dans le surnageant de culture sont présentés Figure 38.

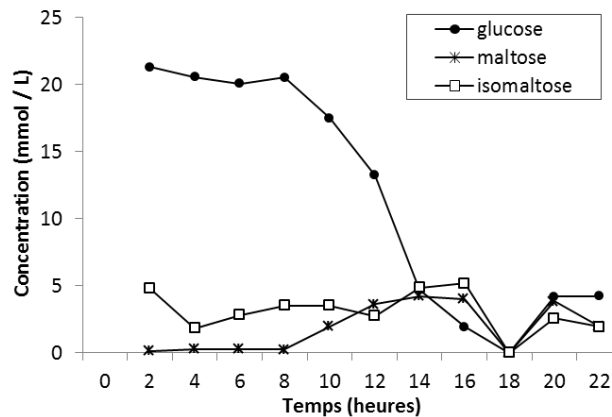


Figure 38: Dosage des glucides dans le surnageant de culture de *B. subtilis* CU1 au cours de la croissance en présence de bile. Croissance en milieu minimum supplémenté avec 1% d'un mélange glucose/IMOS en présence de 0,5% (p/v) de bile. Les résultats présentés sont les moyennes de deux expériences indépendantes.

Le dosage de l'activité α -glucosidase dans le surnageant de culture dans les mêmes conditions a été réalisé comme précédemment durant 48 h (Figure 39).

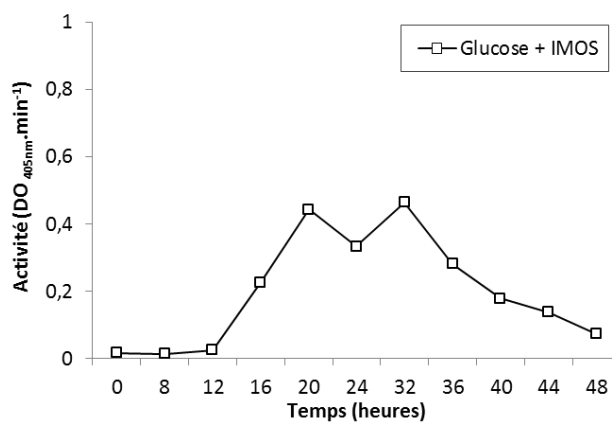


Figure 39: Suivi cinétique de la production de l'activité α -glucosidase dans le surnageant de culture de *B. subtilis* CU1 en présence de bile. Croissance en milieu minimum supplémenté avec 1% d'un mélange glucose/IMOS en présence de 0,5% (p/v) de bile. Les résultats présentés sont les moyennes de deux expériences indépendantes.

Si l'on s'intéresse dans un premier temps au dosage des glucides (Figure 38), on peut noter que la concentration en isomaltose diminue très rapidement en début de croissance (jusqu'à 4 h), puis augmente à nouveau pour atteindre une valeur proche de sa concentration initiale vers 8 h. En ce qui concerne la concentration en glucose, son évolution est assez similaire à celle de l'isomaltose dans l'expérience précédente lors de la croissance sur IMOS. En effet, la consommation en glucose est faible en début de croissance (jusqu'à 8 h) puis sa concentration diminue très rapidement jusqu'à atteindre une valeur quasi nulle après 18 h de croissance. L'évolution de la concentration en maltose, est également quasi identique à celle observée lors de la croissance sur IMOS Figure 36. La concentration en maltose dans le surnageant est maintenue à sa valeur initiale durant les 8 premières heures de culture, puis va augmenter progressivement jusqu'à atteindre une valeur de l'ordre de 5 mM après 12 h. La concentration en maltose décroît fortement entre 16 h et 18 h de culture pour atteindre une valeur quasi nulle.

En observant le suivi cinétique de l'activité α -glucosidase dans le surnageant de culture, on peut noter que lorsque le milieu est supplémenté en glucose, l'activité enzymatique est réduite de moitié durant toute l'expérience (Figure 39). L'activité α -glucosidase apparaît à partir de 12 h de culture, alors que qu'en absence de glucose (Figure 37), l'augmentation était observable dès le début de la croissance de la souche. De plus, il ne semble pas y avoir une corrélation étroite entre l'évolution de la concentration des différents oses et l'évolution de l'activité enzymatique mesurée. En effet, l'accroissement de la concentration en maltose consécutif à l'hydrolyse d'oligosaccharides de haut DP est observable à partir de 8 h, alors que l'activité α -glucosidase n'apparaît qu'après 12 h de culture, ce qui rend l'interprétation difficile.

Néanmoins, ces résultats laissent supposer que l'utilisation préférentielle d'un substrat carboné en présence de bile est dépendante de sa concentration dans le milieu. Le dosage des oses dans le milieu de culture indique que la bactérie utilise l'isomaltose disponible en premier lieu, et non le glucose, bien que la concentration de ce dernier soit bien supérieure. La production de l'activité α -glucosidase n'est importante qu'à partir de 12 h, ce qui signifie que la souche va hydrolyser les oligosaccharides de DP plus élevés, seulement après avoir consommé le glucose disponible.

Pour tenter de comprendre le lien qui peut exister entre la résistance à la bile et le substrat carboné disponible dans le milieu, il faut considérer les mécanismes mis en jeu dans cette résistance. Les propriétés lipophiles fortes des cycles stéroïdes des sels biliaries font de la membrane plasmique leur cible principale. Ils perturbent la structure de la membrane et la force protomotrice, conduisant à la mort cellulaire (Kurdi *et al.* 2006). Une fois déconjugués, les sels biliaries peuvent entrer par diffusion passive dans la cellule et diminuer le pH cytoplasmique (Sánchez *et al.* 2013), mais ce ne

sont pas les seuls effets ayant été observés. En effet, la bile pourrait induire des stress oxydatifs, un mauvais repliement des protéines, et une altération du métabolisme des sucres (Ruiz *et al.* 2013).

Les mécanismes de résistance à la bile chez le genre *Bacillus* n'ont pas été décrits jusqu'ici dans la littérature. En revanche, ils ont été assez exhaustivement étudiés chez *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. La résistance à la bile serait en fait un phénomène multifactoriel, impliquant un nombre important de processus de détoxification de la bile, et de protection des structures bactériennes. Les principaux mécanismes de résistance à la bile connus sont :

- La mise en place de transports actifs des sels et acides biliaires : transporteurs MDR¹, de la superfamille des récepteurs ABC² (Ruiz *et al.* 2012),
- L'hydrolyse des sels biliaires : déconjugaison de la glycine et de la taurine des sels biliaires,
- Des changements de structure et de composition de la membrane et du peptidoglycane bactérien : production d'EPS et de protéines impliquées dans le métabolisme lipidique (Fanning *et al.* 2012).

Chez les lactobacilles et les bifidobactéries, il semblerait que ces mécanismes ne soient pas les seuls impliqués dans la résistance à la bile. En effet, une réorganisation du métabolisme global de la bactérie, notamment au niveau glycolytique, serait mise en place afin d'augmenter la production d'énergie nécessaire à la réponse à la présence de bile. En augmentant la production d'énergie, les réponses actives décrites précédemment sont favorisées.

Chez les bifidobactéries, il est impossible d'utiliser la glycolyse du fait de l'absence d'aldolase et de glucose-6-phosphate oxydoreductase. Le métabolisme dépend de la présence de fructose-6-phosphate phosphoketolase (F6PPK) ; cette voie métabolique est dénommée « D-fructose-6-phosphate shunt » (Palframan *et al.* 2003). La présence de cette voie particulière chez les bifidobactéries permet de produire plus d'ATP à partir des glucides que les voies classiques hétéro et homofermentaires. Cette voie permet d'obtenir 2,5 moles d'ATP à partir de 1 mole de glucose (2 moles d'ATP par mole de glucose sont obtenues par la glycolyse), ainsi que 1,5 moles d'acétate et de 1 mole de lactate, deux acides organiques impliqués dans les propriétés associées aux prébiotiques (Palframan *et al.* 2003). L'utilisation d'une voie métabolique particulière en présence de bile pourra être mise en évidence chez *Bacillus subtilis* CU1 par détermination des concentrations en AGCCs et en acide lactique au cours de la croissance de la souche comme cela a été réalisé précédemment dans la section 5.

Des changements dans le métabolisme des glucides en présence de bile ont été démontrés chez *Bifidobacterium animalis* et *Bifidobacterium longum*. Cette réponse particulière semble être

¹ Pour « multidrug transporters ».

² Pour récepteurs à « ATP Binding Cassette », récepteurs membranaires utilisant l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour le transport unidirectionnel.

dépendante de la souche. Alors que *B. longum* accumule la plupart des enzymes de la voie glycolytique, ce qui suggère une augmentation de la consommation de glucose en présence de bile, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* présente une accumulation d'enzymes impliquées dans la formation de fructose-6-phosphate, fructose-6-phosphate phosphocétolase, et glyceraldehyde-3-phosphatedeshydrogenase, qui sont les seules enzymes surexprimées lors du « D-fructose-6-phosphate shunt » (Sánchez *et al.* 2005; Sánchez *et al.* 2007). Une analyse physiologique a confirmé une augmentation de la consommation du glucose par les cellules de *Bifidobacterium longum* exposées aux sels biliaires, ce qui n'est pas observé chez *Bifidobacterium animalis*. Par conséquent, une augmentation de la production de l'ATP après une incubation avec la bile semble se produire par des voies différentes: tandis que *Bifidobacterium longum* augmente la production d'ATP par la glycolyse, *Bifidobacterium animalis* augmente la phosphorylation au niveau du substrat (Sanchez *et al.* 2007).

Une étude de Perrin et coll. (2000) a démontré que la résistance à la bile de *Bifidobacterium breve* et *Bifidobacterium longum* est augmentée si le milieu contient des FOS plutôt que ses composants monomériques (glucose et fructose). Il semblerait que l'effet de la bile puisse être limité par l'addition d'une source de carbone dont le métabolisme permet à la souche de mettre en place les mécanismes de détoxification énergie-dépendants. Il est possible que de plus hauts rendement énergétiques soient obtenus avec les oligosaccharides comparativement à ceux obtenus avec les monosaccharides, contribuant ainsi à une meilleure résistance à la bile. Les mécanismes de résistance à la bile pourraient également être liés à une augmentation de l'activité d'enzymes glycolytiques.

L'influence de la source carbonée dans la tolérance à la bile a également été étudiée (Ruas-Madiedo *et al.* 2005). Les auteurs ont suivi la croissance et la fermentation de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* IPLA 4549, et de son homologue résistant à la bile, dans un milieu contenant du glucose ou du maltose comme source carbonée. Cette étude met en évidence qu'en absence de bile, le maltose conduit à une croissance plus favorable de la souche résistante à la bile, comparativement à ce qui est observé avec le glucose. Les auteurs supposent également que la souche résistante adapte son métabolisme afin d'augmenter les rendements en ATP en utilisant préférentiellement le maltose, bien qu'elle puisse toujours utiliser le glucose si l'apport nutritionnel diminue. Une étude protéomique suggère que pour la souche résistante à la bile, le « D-fructose-6-phosphate shunt » se déplace vers d'autres voies métaboliques, c'est à dire, vers la dégradation de l'acide oxalique, qui pourrait théoriquement augmenter la production d'ATP (Sánchez *et al.* 2007). En effet, en présence de bile, la souche de *Bifidobacterium animalis* résistante maintient une concentration en ATP supérieure à celle de son homologue sauvage (Sánchez *et al.* 2005).

Afin de mettre en évidence les mécanismes spécifiques impliqués dans la résistance à la bile de *B. subtilis* CU1, et l'influence de la source carbonée sur les mécanismes de résistance, une étude

protéomique par 2D-PAGE est envisagée. Les protéines seront extraites de la souche en fin de phase exponentielle de croissance sur 0,5% de bile en présence de glucose ou d'IMOS comme unique substrat carboné.

L'identification de protéines d'intérêt impliquées dans les effets bénéfiques des probiotiques, grâce à l'analyse protéomique, est une première étape. Le rôle précis de protéines identifiées comme « variants » dans la résistance à la bile devra être étudié par la technique d'inactivation des gènes (*knock out*) permettant l'obtention de mutants n'exprimant plus les gènes codant pour ces protéines d'intérêt. Les mutants pourront être testés *in vitro* et *in vivo*, en comparaison avec la souche sauvage, afin de mettre en évidence les propriétés probiotiques supportées par ces protéines.

9. Influence de la source carbonée sur la structure d'entités moléculaires de la surface de *B. subtilis* CU1 : les acides lipotéichoïques

Les acides lipotéichoïques (LTA) sont des polymères amphiphiles insérés dans la membrane plasmique de la bactérie et traversant le peptidoglycane. Chez *Bacillus*, la structure de la chaîne hydrophile a été décrite comme étant un polymère d'unités répétées de glycérol-phosphate, pouvant être substituées en position 2 du glycérol par de la D-alanine ou de la N-acétylglucosamine. Cette partie hydrophile est liée à une ancre hydrophobe insérée dans la membrane et composée d'un disaccharide, appelé gentiobiose, lui-même associé à un diacylglycérol. Les LTAs sont des antigènes bactériens qui peuvent induire une réponse immunitaire par des cellules eucaryotes, ce qui suggère leur possible implication dans l'activité immunomodulatrice induite par certaines bactéries probiotiques.

L'influence des conditions environnementales sur la structure et la composition des LTAs a été peu décrite, mais il est possible que l'apport en nutriment entraîne une modification de la structure des LTAs. De plus, la structure des LTAs joue un rôle fondamental dans l'induction d'effets immunologiques, notamment au niveau du taux de substitution de la chaîne de glycérol-phosphate par de la D-alanine. Dans cette section, nous faisons l'investigation de l'effet de la source carbonée sur la structure des LTAs, susceptible de conduire à une modification de leur activité biologique.

Pour cela les, LTAs sont extraits de la paroi de *B. subtilis* CU1 en fin de phase exponentielle de croissance sur glucose ou IMOS, par une méthode utilisant du *n*-butanol et décrite par Morat et coll. (2001), puis purifiés par une séquence chromatographique en deux étapes (Ryu *et al.* 2009). La

structure des LTAs, extraits dans les deux conditions de culture distinctes, est analysée par RMN ^1H comme décrit dans la section 5 de la seconde partie du « Matériel et méthodes ».

A titre d'exemple, le spectre RMN ^1H total des LTAs de *B. subtilis* CU1 cultivé sur glucose est présenté ci-dessous (Figure 40).

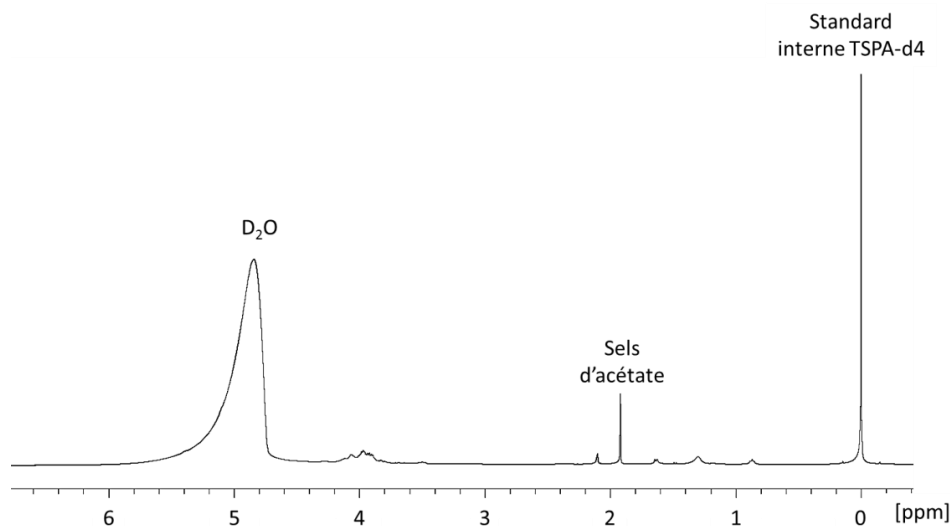


Figure 40: Spectre RMN ^1H total des LTAs de *B. subtilis* CU1 cultivé sur glucose.

Ce spectre met en évidence la présence de l'étalon interne TSPA-d4 utilisé pour le référencement des déplacements à 0 ppm, du solvant deutéré D_2O (4,9 ppm), et celle des sels d'acétate dans l'échantillon (1,9 ppm), ces derniers étant liés au procédé de purification des LTAs. La zone d'intérêt sur les spectres RMN ^1H de LTAs se trouve entre 0,6 et 4,4 ppm. Les spectres obtenus pour les LTAs de *B. subtilis* CU1 extraits après croissance sur glucose ou IMOS, ainsi que leur structure supposée sont présentés Figure 41.

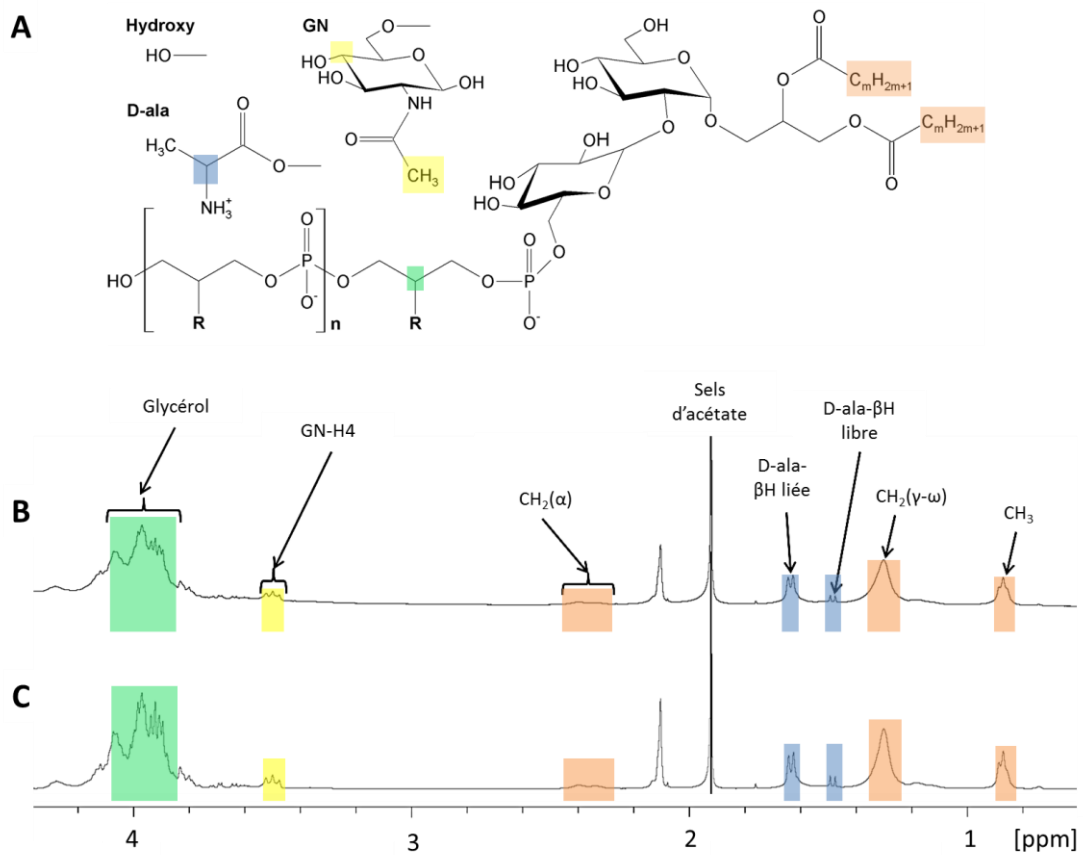


Figure 41: (A) Structure moléculaire générale des LTAs de *B. subtilis* CU1 d'après les analyses RMN ¹H. *n* représente le nombre d'unités glycérol-phosphate et R le groupe de substitution pouvant être un groupement hydroxyle (Hydroxy), de la D-alanine (D-ala) ou de la *N*-acétylglucosamine (GN). (B) Spectre RMN ¹H des LTAs de *B. subtilis* CU1 cultivé sur glucose, (C) cultivé sur IMOS.

Les spectres RMN ¹H obtenus lors de précédentes études (Morath *et al.* 2001; Jang *et al.* 2011; Wörmann *et al.* 2011) sont utilisés comme références pour l'assignation des déplacements chimiques. Les résultats de quantification sont résumés dans le Tableau 22.

	Analyse structurale des LTAs en fonction de la source carbonée	
	Source carbonée	Source carbonée
	glucose	IMOS
Nombre d'unités glycérol-phosphate (n)	21	21
Taux de substitution par la D-alanine	9%	6%
Taux de substitution par la <i>N</i> -acétylglucosamine	3%	3%
Pourcentage molaire d'alanine libre (par rapport à l'alanine totale)	10%	10%
Longueur de chaîne des acides gras	5	5

Tableau 22: Analyse structurale des LTAs de *B. subtilis* CU1 par RMN ¹H après croissance sur milieu MH, glucose ou IMOS comme unique source carbonée.

Les résultats présentés sont basés sur un unique extrait de LTA, mais les analyses réalisées sur d'autres extraits ont montré des résultats comparables (résultats non-présentés).

Sur les spectres RMN ¹H, on retrouve les signaux caractéristiques du glycérol entre 3,8 ppm et 4,2 ppm, ceux-ci sont utilisés pour l'estimation du nombre d'unités glycérol-phosphate. Le signal à $\delta = 3,45$ ppm est utilisé pour la détermination du taux de substitution par la *N*-acétylglucosamine, tandis que pour la D-alanine ce sont les signaux à $\delta = 1,64$ ppm et $\delta = 4,3$ ppm qui sont pris en compte.

Les résultats RMN ¹H obtenus pour les LTAs de *B. subtilis* CU1 cultivé sur glucose ou IMOS sont similaires. En effet, la longueur moyenne de chaîne hydrophile est de 21 unités glycérol-phosphate, et le taux de substitution par la *N*-acétylglucosamine est de 3%. Cela signifie que sur l'ensemble des unités glycérol-phosphate, 3% d'entre elles sont substituées par de la *N*-acétylglucosamine. La longueur de chaîne d'acides gras est estimée à 5 carbones dans les deux conditions. Ce résultat semble être sous-estimé, et nécessiterait une investigation plus poussée. Seul le degré de substitution par la D-alanine est différent entre les deux conditions, estimé à 9% pour la condition glucose, et à 6% pour la condition IMOS. Cela laisse supposer qu'en fonction des conditions nutritionnelles, la seule partie significativement variable des LTAs serait le degré de substitution par la D-alanine.

On peut noter la présence de D-alanine libre dans les échantillons, de l'ordre de 10% par rapport l'alanine totale (c'est-à-dire liée plus libre). Nous verrons dans la deuxième partie des résultats que

cela est la conséquence d'une faible hydrolyse de la liaison ester entre la D-alanine et le glycérol, et ceci malgré les précautions prises pour la conservation des échantillons (-20°C), suivi de leur analyse réalisée dans un délai n'excédant pas cinq jours après la purification.

Les résultats obtenus concernant la longueur de la chaîne de glycérol-phosphate sont comparables à ceux rapportés par Morath et coll. (2002) dans une étude consacrée notamment aux LTAs de *B. subtilis* DSMZ 1087. Les auteurs ont mis en évidence des squelettes hydrophiles relativement courts, avec une valeur de $n = 22$. Nos observations confirment la présence de LTAs avec des chaînes hydrophiles relativement courtes chez le genre *Bacillus*. En revanche, les taux de substitution des LTAs de *B. subtilis* DSMZ 1087, par la D-alanine et la *N*-acétylglucosamine, atteignent 25% chacun, des valeurs très supérieures à celles mesurées pour les LTAs de *B. subtilis* CU1. Ces observations confirment la variabilité inter-souches de la structure des LTAs.

Une étude antérieure réalisée sur les LTAs de plusieurs souches de *Bacillus* (*B. cereus*, *B. subtilis* et *B. licheniformis*) fait état de chaînes de glycérol-phosphate allant de 25 à 35 unités, des taux de substitution par la D-alanine allant de 0% à 90% (45% en moyenne), et de très faibles taux de substitution par la *N*-acétylglucosamine (Iwasaki *et al.* 1989). Il reste cependant difficile de comparer ces résultats avec ceux de notre étude, les auteurs ayant extraits les LTAs par une méthode utilisant du phénol à chaud, susceptible d'altérer partiellement la structure des molécules, et utilisant des techniques de caractérisation non-spectroscopiques.

Nos résultats suggèrent que la source carbonée disponible dans l'intestin, pourrait conduire à une modification de la structure des LTAs, plus particulièrement le taux de substitution de la chaîne hydrophile par la D-alanine. Ces modifications, bien que mineures, pourraient être à l'origine d'une modulation de l'activité biologique des LTAs de manière structure-dépendante (Morath *et al.* 2005), et pouvant modifier l'activité biologique de la bactérie probiotique (Grangette *et al.* 2005). Le rôle de la structure des LTAs dans l'activité biologique sera discuté dans la seconde partie du chapitre « Résultats & discussion ».

Conclusion & perspectives

Les résultats présentés dans cette section constituent une étude préliminaire de l'association d'un probiotique *B. subtilis* CU1 avec un substrat prébiotique IMOS. La capacité de la souche à utiliser ce substrat comme source carbonée a été démontrée, ainsi que la production d'une enzyme du type α -glucosidase excrétée dans le surnageant de culture, exclusivement en présence d'IMOS. Les résultats obtenus laissent penser que le glucose pourrait être un répresseur de la production de cette enzyme. Les essais d'adhésion sur modèle cellulaire Caco-2 n'ont pas permis de mettre en évidence une influence de la source carbonée sur la capacité de la souche à adhérer à un modèle de cellules épithéliales intestinales. Les IMOS ne permettraient pas d'augmenter l'adhésion aux cellules intestinales. En revanche, ils semblent favoriser la tolérance à la bile des spores et des cellules végétatives de *B. subtilis* CU1. Ce substrat carboné pourrait permettre à la souche d'augmenter ses rendements énergétiques afin de mettre en place des mécanismes de détoxification des sels biliaries. L'analyse du protéome de la souche en présence d'IMOS est actuellement en cours d'investigation avec comme objectif la mise en évidence des voies métaboliques utilisées pour la dégradation des oligosaccharides, ainsi que celles de biomarqueurs caractéristiques du potentiel probiotique.

Ces premiers résultats *in vitro*, bien qu'encourageants, ne sont pas directement représentatifs du comportement de la souche *in vivo*. En effet, les informations obtenues suggèrent que l'ingestion d'IMOS, en association avec *B. subtilis* CU1, pourrait conduire à un passage de la forme sporulée vers la forme végétative de la souche plus précoce qu'en absence du prébiotique, et ce malgré la présence de bile. La mise en place des effets bénéfiques associés à la souche seraient alors favorisée (Figure 42).

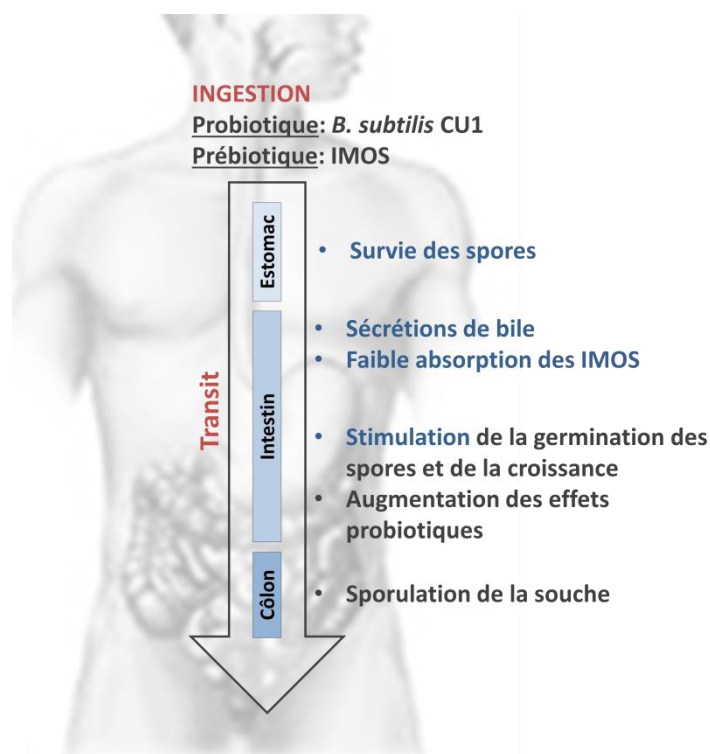


Figure 42: Hypothèse de l'effet des IMOS sur la souche *B. subtilis* CU1 *in vivo*

Afin de valider cette hypothèse, plusieurs approches seraient à envisager pour la suite du travail.

Différents travaux ont démontré l'influence des probiotiques sur le système immunitaire de l'hôte. Ils modulent l'activité des cellules immunitaires, stimulent la production de cytokines pro ou anti-inflammatoires, ou renforcent l'immunité contre les infections (Nagpal *et al.* 2012). D'autre part, Hosono et coll. (2003) ont établi que, en stimulant directement la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires au niveau des plaques de Peyer notamment. L'interaction directe des oligosaccharides avec les cellules de l'intestin pourrait induire une immunomodulation par l'interaction avec des récepteurs spécifiques des cellules immunitaires, en interférant avec le recrutement de leucocytes vers les sites d'inflammation, ou en inhibant les interactions entre les lymphocytes (Jeurink *et al.* 2013). Ainsi, sur la base des résultats acquis, nous proposerions de faire l'investigation de l'effet immunomodulateur des IMOS seuls sur les cellules de l'intestin, mais également leurs effets sur l'activité immunomodulatrice de la souche *B. subtilis* CU1. Nous envisagerions dans un premier temps de mettre en évidence l'effet direct des IMOS en incubant l'oligosaccharide avec des cellules de l'immunité telles que les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC). Les niveaux de cytokines produites dans le surnageant des cellules immunitaires seront déterminés par des méthodes de dosage de cytokines (technique ELISA par exemple).

La modification du protéome induite par le substrat IMOS est représentative de leurs effets sur la physiologie de cette souche. Ces changements physiologiques peuvent être à l'origine d'une modification des entités moléculaires de la surface de la bactérie, et donc de son activité immunomodulatrice. Nos résultats mettent en évidence que la croissance de la souche, en présence d'IMOS engendre une faible modification de la structure des LTAs de *B. subtilis* CU1 qui concerne principalement le taux de substitution par la D-alanine. Malgré le caractère faiblement significatif de ces résultats, ils laissent supposer que d'autres composants de la paroi, qu'ils soient de nature protéique ou polysaccharidique, peuvent voir leurs structures modifiées. Afin de mettre en évidence une modification des propriétés immunomodulatrices de la souche *B. subtilis* CU1, nous envisagerions d'incuber des cellules immunitaires (PBMC) avec la souche après croissance sur glucose ou IMOS. Comme cela a été proposé précédemment, les niveaux de cytokines produites dans le surnageant des cellules immunitaires seraient déterminés par la technique ELISA.

La résistance à la bile est une caractéristique importante pour la sélection d'une souche probiotique. La bile est sécrétée dans le duodénum et réabsorbée par les vaisseaux sanguins de l'iléon. Une colonisation transitoire de la muqueuse intestinale nécessite que les bactéries probiotiques puissent résister aux sels biliaires et se développer en leur présence. Nous avons démontré, qu'en présence d'IMOS, les cellules végétatives de *B. subtilis* sont capables de croître en présence de 0,5% de bile dans le milieu de culture. De plus, une germination des spores est également observée dans ces mêmes conditions expérimentales. Les IMOS pourraient apporter une source carbonée disponible pour *B. subtilis* CU1, rendant les conditions favorables à son développement dans l'environnement intestinal. Afin de comprendre l'effet des IMOS sur la physiologie de la souche probiotique dans un milieu contenant de la bile, une seconde perspective serait de réaliser une étude protéomique par 2D-PAGE après croissance de *B. subtilis* CU1 sur un substrat IMOS et en présence de bile. Cette approche pourrait permettre d'élucider des mécanismes à l'origine de l'augmentation de la tolérance à la bile de la souche en présence de ce substrat prébiotique, et ainsi d'apporter un complément d'information sur les effets bénéfiques de l'association synbiotique *B. subtilis* CU1/IMOS (Hamon *et al.* 2011a; Hamon *et al.* 2011b).

Cette étude *in vitro* devra être complétée par des expériences *in vivo* chez la souris. En effet, nous envisagerions de compléter la ration alimentaire des animaux avec le probiotique seul, le prébiotique seul, et enfin le prébiotique associé au probiotique. Plusieurs critères d'évaluation du synbiotique seraient à prendre en considération :

- Augmentation de la germination et de la viabilité des bactéries : détermination par des méthodes moléculaires de la population de *B. subtilis* CU1 par gramme de matière dans le contenu luminal,

- Augmentation de l'activité du système immunitaire intestinal : réalisation de coupes histologiques de l'intestin et du côlon, et marquage de cellules immunitaires (cellules dendritiques et lymphocytes T). Le suivi de la production d'IgA et de cytokines dans le contenu luminal pourrait être réalisé par un dosage direct par la méthode ELISA. Ces essais pourraient être conduits à la fois sur des souris saines, et sur des modèles d'inflammation induite (par dextran sodium sulfate par exemple).

L'ensemble de ces résultats permettrait de conclure quant au potentiel de l'association synbiotique de la souche probiotique *B. subtilis* CU1 avec le substrat prébiotique IMOS, et des effets bénéfiques produits chez l'animal. Ces résultats sont en préparation pour publication dans le journal *Applied and Environmental Microbiology*.

2

Etude de la relation structure/activité des acides lipotéichoïques de trois souches probiotiques du genre *Bacillus*

- Préambule -

Pour manifester leurs effets bénéfiques, les microorganismes probiotiques doivent interagir avec les cellules du tractus intestinal. Cette interaction est tributaire d'entités moléculaires présentes à la surface du microorganisme ou bien sécrétées sous forme soluble dans le milieu, et pouvant être reconnues spécifiquement par les cellules du tractus intestinal. Parmi ces entités, on trouve chez les bactéries à Gram positif, les acides lipotéichoïques (LTA). Ce sont des molécules amphiphiles insérées dans la membrane plasmique, qui traversent le peptidoglycane et émergent à la surface cellulaire. Ces molécules, sont reconnues par des récepteurs cellulaires de l'hôte et sont à l'origine d'une partie des effets bénéfiques des bactéries probiotiques. Les LTAs seraient notamment impliqués dans la modulation de la réponse immunitaire des cellules de l'épithélium intestinal et des tissus lymphoïdes associés. Toutefois, les mécanismes complexes par lesquels les probiotiques interagissent avec les cellules de l'hôte et induisent leurs effets bénéfiques restent encore mal connus, ce qui confère à leur étude un grand intérêt, particulièrement dans le cadre de l'application de ces microorganismes à des fins thérapeutiques.

Plusieurs études ont permis de mettre en évidence les effets biologiques des LTAs, qui semblent être intimement liés à leur structure et à leur conformation spatiale. Dans cette section, nous avons comparé la structure et l'activité biologique de LTAs extraits de trois souches distinctes de *Bacillus* utilisées en tant que probiotiques, afin de mettre en évidence une possible relation structure/activité de ces molécules. Les LTAs des trois souches probiotiques *Bacillus cereus* CH, *Bacillus subtilis* CU1 et *Bacillus clausii* O/C sont purifiés et leurs structures chimiques caractérisées. Les effets biologiques des LTAs purifiés sont déterminés *in-vitro* sur une lignée cellulaire de carcinome de côlon et des cellules immunitaires isolées de sang périphérique, afin d'évaluer leur capacité potentielle à moduler la réponse immunitaire intestinale. La stratégie adoptée dans cette étude est résumée dans l'organigramme suivant :

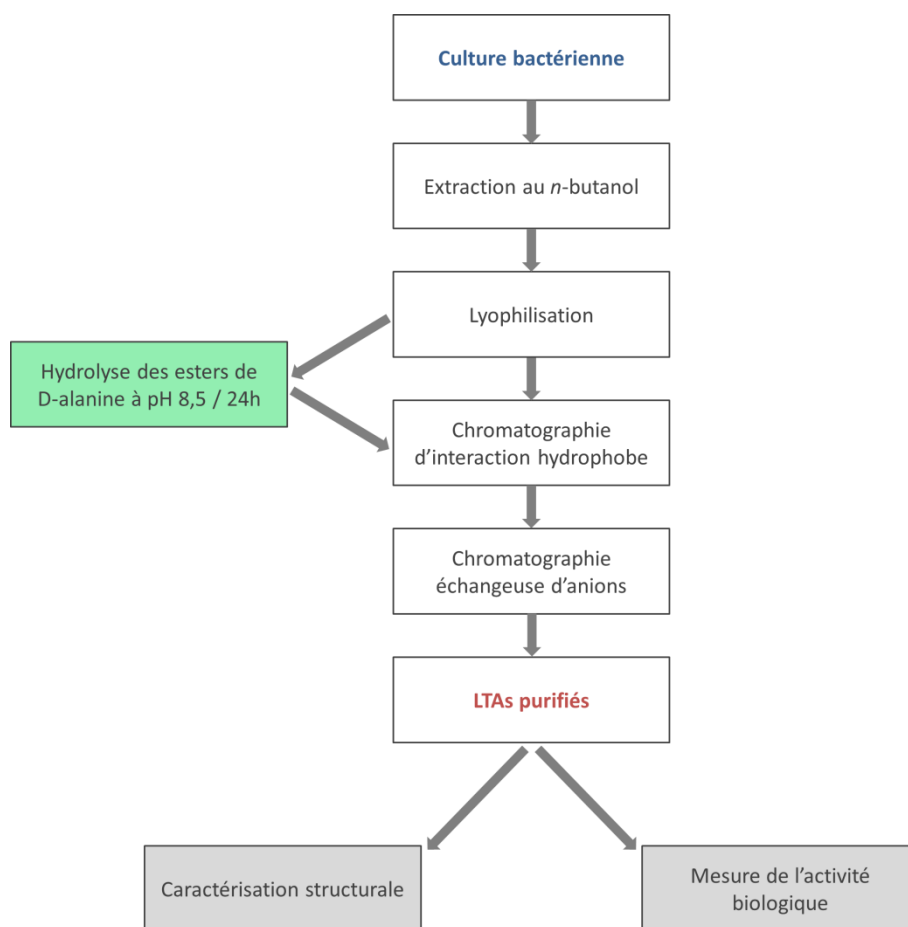


Figure 43: Organigramme de présentation de la stratégie adoptée pour l'étude de la relation structure-activité des LTAs

Ce travail s'inscrit dans la compréhension des mécanismes impliqués dans l'interaction probiotique/hôte, dans l'objectif à long terme de pouvoir optimiser l'utilisation de tels microorganismes en alimentation-santé par exemple.

1. Extraction et purification des LTAs

Les LTAs ont été extraits selon une méthodologie décrite dans la littérature (Morath *et al.* 2001) et comme la seule méthode permettant l'obtention de LTAs purifiés sans modification induite de leur structure. La technique utilisée antérieurement mettait en jeu un traitement à chaud en présence de phénol, dans des conditions faiblement alcalines, susceptibles d'engendrer la perte de résidus D-alanine et/ou glycosyl par lyse des liaisons esters.

Les cellules bactériennes sont collectées en fin de phase exponentielle, après croissance sur milieu nutritif MH, et sont soumises à une extraction au *n*-butanol à température ambiante. La phase aqueuse de l'extrait est purifiée dans une première étape par chromatographie d'interactions hydrophobes sur colonne Octyl-Sepharose. L'éluion sélective des LTAs est réalisée par un tampon acétate d'ammonium 0,1 M contenant du 1-propanol à 35% (v/v). Le chromatogramme (Figure 44) obtenu à partir d'un lysat cellulaire de *B. subtilis*, est établi après dosage du phosphore sur chaque fraction d'éluat, le phosphore étant le composant majoritaire des LTAs). Les mêmes résultats ont été obtenus à partir des lysats de *B. cereus* et *B. clausii*.

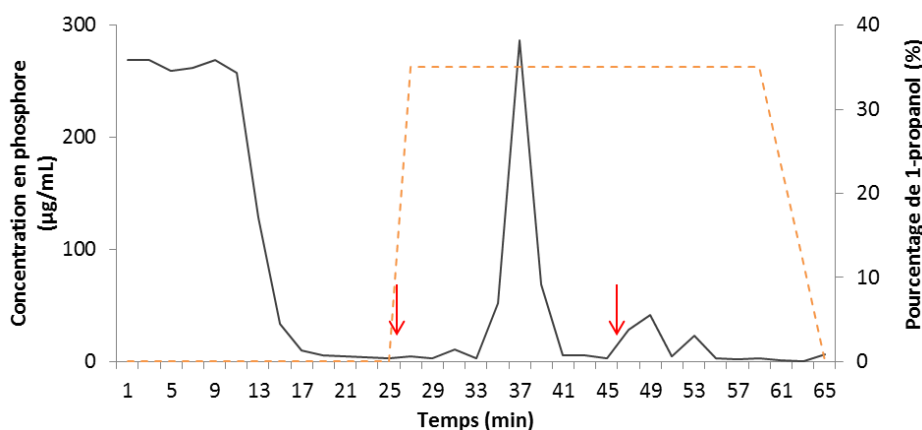


Figure 44: Chromatogramme obtenu lors de la purification des LTAs de *B. subtilis* CU1 par chromatographie d'interactions hydrophobes. Le gradient d'éluion par le 1-propanol est représenté en orange. Les flèches indiquent les limites d'éluion des LTAs

Cette étape permet de séparer les LTAs de leurs contaminants majoritaires tels que les acides nucléiques et les protéines, élués entre 0 et 18 minutes. Les fractions riches en phosphore (éluées entre 26 et 46 min) sont rassemblées, puis ajustées à 20 mM en acétate d'ammonium et à 30% en 1-propanol. Ces fractions sont soumises à une seconde étape de purification par chromatographie sur échangeur d'anions DEAE-sépharose. Les LTAs sont élués en 70 min par un gradient linéaire de NaCl de 0 à 1 M, en solution dans un tampon acétate d'ammonium 20 mM/pH 4.7/30% 1-propanol. Le

chromatogramme obtenu est présenté (Figure 45). Il résulte du dosage du phosphore dans chaque fraction d'éluat collectée.

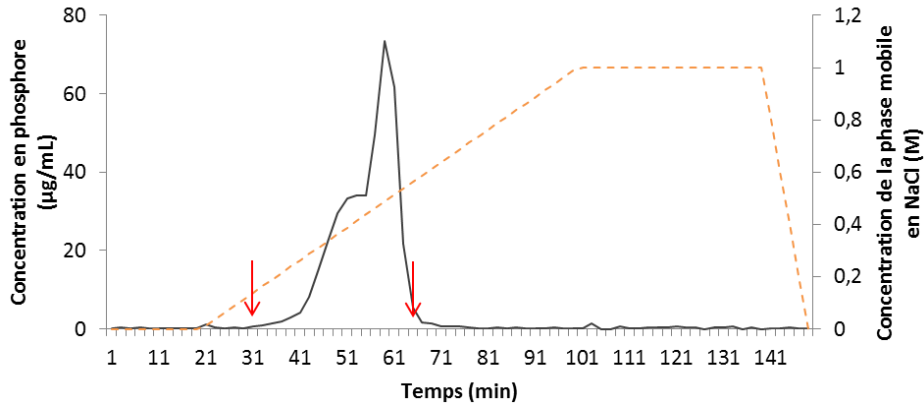


Figure 45: Chromatogramme obtenu lors de la purification des LTAs de *B. subtilis* CU1 par chromatographie d'échange d'ions. Le gradient d'élution par le NaCl est représenté en orange. Les flèches indiquent les limites de collecte de la fraction de LTAs purifiés.

Le profil chromatographique observé après séparation sur échangeur d'anions fait apparaître un épaulement entre les temps d'élution 33 et 51 min, en amont du pic majoritaire, ce qui témoigne d'une hétérogénéité des charges nettes des composés élués. Ce type de comportement est rapporté dans la littérature (Ryu *et al.* 2009), et est attribué à la micro-hétérogénéité structurale des LTAs. Les fractions concentrées en phosphore (éluées entre 37 et 69 min pour l'exemple de *B. subtilis* CU1) ont été rassemblées et dialysées contre 5 L de solution acétate de sodium 5 mM/pH 4,7 pendant 24 h. Ce dialysat, qui constitue la fraction de LTAs purifiés, est analysé afin de déterminer les compositions qualitatives et quantitatives en acides aminés, acides gras, oses et glycérol.

Il est important de noter que la stabilité des LTAs dans le temps est limitée. En effet, malgré une conservation des LTAs à -20°C, une hydrolyse spontanée et progressive des ester de D-alanine est observable par CCM (Figure 46).

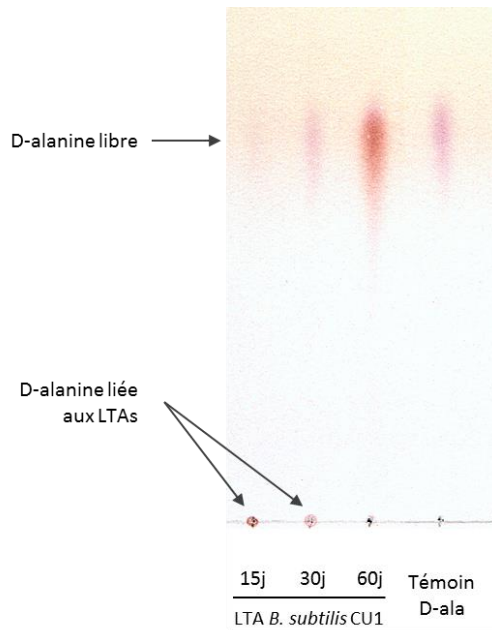


Figure 46: CCM des LTAs extraits de *B. subtilis* CU1 après 15, 30 et 60 jours de conservation à -20°C. Un témoin a été réalisé avec de la D-alanine. L'élution est réalisée sur une phase stationnaire de cellulose microcristalline par un mélange butanol/acide acétique/eau 3:3:1 (v/v/v). Révélation par de la ninhydrine 1% dans l'acétone et incubation à 110°C/15min.

Ces résultats mettent en évidence la perte rapide de l'intégrité structurale des LTAs. Par conséquent, les travaux exposés dans la suite du manuscrit, la caractérisation structurale et les essais biologiques, ont été réalisés simultanément dans les 10 jours suivant l'extraction des LTAs.

2. Caractérisations chimique et structurale des LTAs

Deux méthodes sont rapportées dans la littérature pour la détermination de la composition chimique des LTAs. La première consiste à utiliser des méthodes de dosages biochimiques indépendants pour chacun des constituants de la structure (glucides, phosphore, acides aminés et acides gras), mais cette méthode est lourde à mettre en œuvre et chronophage (Iwasaki *et al.* 1989). La deuxième repose sur l'analyse spectroscopique, généralement réalisée par RMN du proton, une méthode rapide, précise et non-destructive (Morath *et al.* 2001). Dans le travail présenté, nous avons mis en place les deux méthodes complémentaires d'analyse afin d'obtenir des informations précises et de valider les structures des LTAs.

2.1. Caractérisation des LTAs par dosages biochimiques

Les compositions sont déterminées comme décrit dans la section 4 de la partie « Matériels et méthodes » correspondante. Les résultats obtenus pour la composition en phosphore, acides aminés, acides gras, oses et glycérol, sont exprimés en moles de constituants identifiés par mole de phosphore présents dans les LTAs purifiés, et sont présentés dans le tableau Tableau 23.

Composés	<i>B. cereus</i> CH	<i>B. subtilis</i> CU1	<i>B. clausii</i> O/C
Phosphore	1	1	1
Glycérol	0,321	0,346	0,497
D-alanine	0,277	0,351	0,908
Glucose	0,016	0,013	0,047
Acides gras	0,174	0,224	0,222

Tableau 23: Composition chimique des acides lipotéichoïques de chacune des souches étudiées.

Le rapport molaire glycérol/phosphore varie entre 0,321 et 0,497. D'après la structure des LTAs, ce rapport devrait être équimolaire. Cela suppose que les dosages du glycérol, et donc des glucides, ne permettent pas d'obtenir des résultats cohérents. Cela peut être dû à une hydrolyse incomplète des échantillons. L'analyse de la composition en alanine et en acide gras est en accord avec les valeurs retrouvées dans la littérature. Néanmoins, une analyse par RMN ^1H , plus précise, va nous permettre de confirmer ces résultats.

2.2. Caractérisation des LTAs par RMN ^1H

L'analyse RMN ^1H a été réalisée pour chacun des LTAs et les spectres obtenus sont présentés (Figure 47 B, C et D). La structure générale des LTAs a également été rappelée (Figure 47 A).

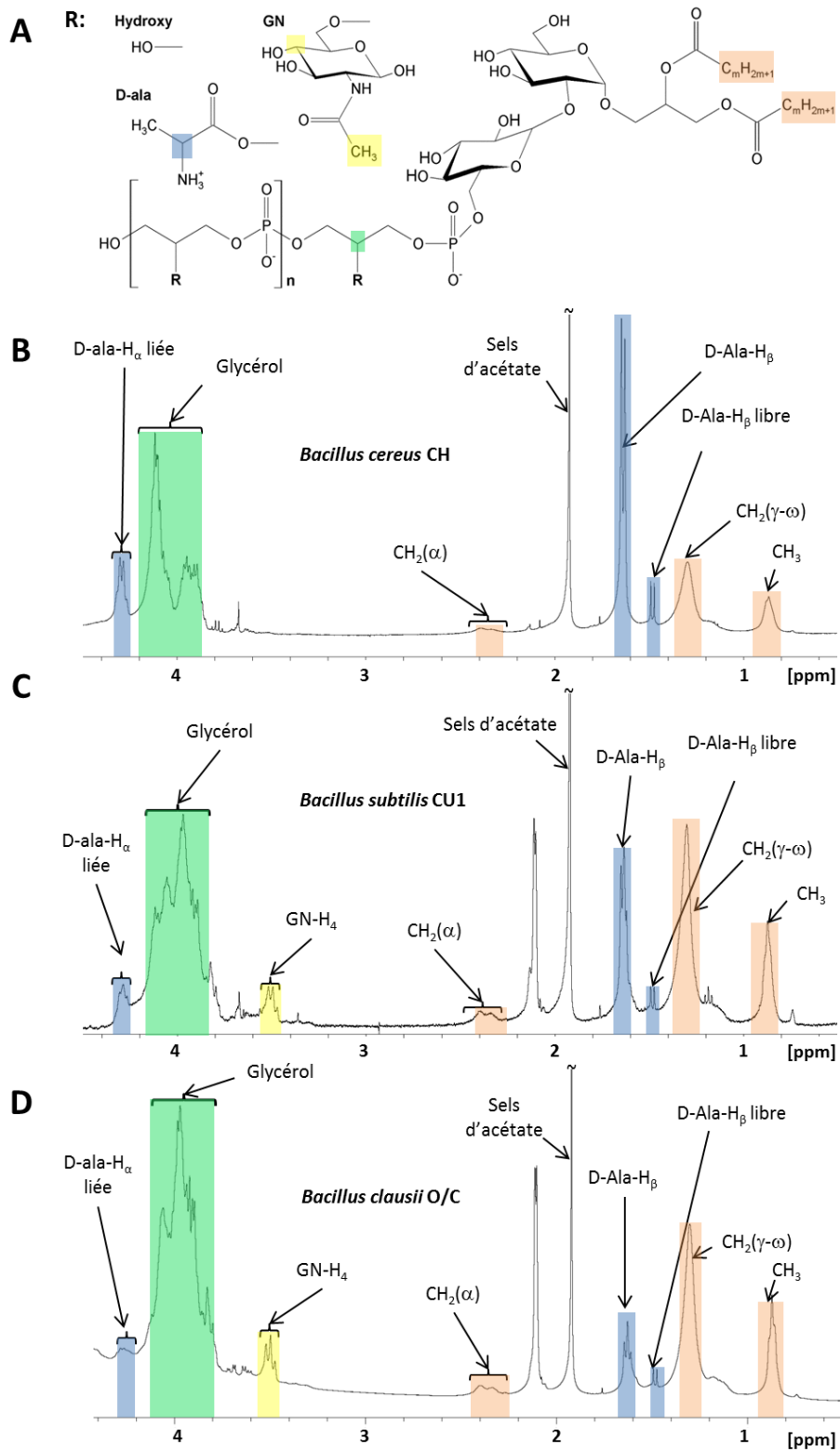


Figure 47: (A) Structure moléculaire générale des LTAs de *Bacillus* d'après les analyses RMN ^1H . n représente le nombre d'unités glycérol-phosphate et R le groupe de substitution pouvant être un groupement hydroxyle (Hydroxy), de la D-alanine (D-ala) ou de la N-acétylglucosamine (GN). (B) Spectre RMN ^1H de *B. cereus* CH, (C) de *B. subtilis* CU1, et (D) de *B. clausii* O/C.

Comme nous l'avons déjà évoqué dans la section 5.2 de la partie « Matériel & Méthodes » correspondante, les spectres RMN ¹H établis par Morath et coll. (2001), Jang et coll. (2011), et Wörmann et coll. (2011) ont été utilisés comme références pour l'assignation des déplacements chimiques. Les résultats de quantification sont résumés dans le Tableau 24.

	<i>B. cereus</i> CH	<i>B. subtilis</i> CU1	<i>B. clausii</i> O/C
Nombre d'unités glycérol-phosphate (n)	28	23	20
Taux de substitution par la D-alanine	41%	17%	3%
Taux de substitution par la <i>N</i> -acétylglucosamine	0%	7%	3%
Masse moléculaire estimée (Da)	5 800	4 900	4 000

Tableau 24: Analyse structurale des LTAs de *B. cereus* CH, *B. subtilis* CU1, et *B. clausii* O/C par RMN ¹H après croissance sur milieu MH.

Le spectre RMN ¹H des LTAs *B. cereus* met en évidence une chaîne de glycérol-phosphate plus longue que celle observée pour les deux autres souches. La longueur moyenne est de 28 unités répétées, et le degré de substitution par la D-alanine est supérieur à ceux mesurés pour *B. clausii* O/C et *B. subtilis* CU1 (41%), et une absence de glucosamine est observée. Les LTAs de *B. subtilis* semblent être constitués d'une chaîne hydrophile d'une longueur moyenne de 23 monomères, substituée par environ 17% de D-alanine et par 7% de *N*-acétylglucosamine. Le squelette hydrophile des LTAs de *B. clausii*, possède un degré de polymérisation de 20, et est substitué par 3% de *N*-acétylglucosamine et seulement 3% de D-alanine. Les résultats concernant la longueur de chaîne glycérol-phosphate sont en accord avec une étude antérieure réalisée sur des LTAs de *Bacillus* (Iwasaki et al. 1989), dont les auteurs ont estimé que le nombre d'unités répétées variait en moyenne de 25 à 35 selon les souches. Cependant, cette détermination n'a pas été réalisée en utilisant une analyse spectroscopique, et la préparation de LTAs avait été effectuée en utilisant une méthode d'extraction au phénol à chaud. Une analyse RMN plus récente réalisée sur les LTAs de *B. subtilis* DSMZ 1087 a mis en évidence des LTAs avec un squelette hydrophile court d'environ 22 unités répétées de glycérol-phosphate en moyenne (Morath *et al.* 2002). Dans notre étude, malgré les différences de composition chimique observables entre les LTAs des différentes souches, nos

observations semblent confirmer la présence d'une chaîne hydrophile relativement courte chez plusieurs espèces de *Bacillus*.

Cependant, Morath et coll. (Morath *et al.* 2002a; Morath *et al.* 2002b) ont déterminé un degré de substitution de 25% pour la D-alanine et pour la *N*-acétylglucosamine, ce qui est relativement différent des valeurs que nous avons obtenues pour la souche de *B. subtilis*. Ces résultats témoignent d'une variabilité de la composition chimique des LTAs au sein d'une même espèce.

Le taux de substitution par la D-alanine est la partie la plus variable de la structure des LTAs des trois souches de *Bacillus* étudiées, avec 17% pour les LTAs de *B. subtilis*, 3% pour ceux de *B. clausii* et 41% pour *B. cereus*. Ces différences majeures pourraient conduire à des activités différentes pour chacun des LTAs. Nos résultats mettent en évidence une distribution des substituants D-alanine inversement proportionnelle à ce qui a été observé précédemment sur les LTAs d'*Enterococcus faecalis* (souche Kiel 27738), qui ont également été extraits par la méthode au phénol à chaud (Leopold et Fischer 1992). On constate que le degré de substitution par la D-alanine croît avec la longueur de la chaîne glycérol-phosphate.

La caractérisation chimique de LTAs extraits de *S. aureus* DSM 20233 a révélé un degré de polymérisation compris entre 45 et 50, avec un taux de substitution élevé pour la D-alanine (70%) et seulement 15% de *N*-acétylglucosamine (Morath *et al.* 2005). La comparaison des structures des LTAs de la bactérie pathogène *S. aureus* avec celles des LTAs de *Bacillus* établies au cours de notre étude met en évidence une importante différence dans leurs compositions. La capacité des cellules eucaryotes à différencier les bactéries pathogènes des non-pathogènes passe par la reconnaissance de différences structurales des entités moléculaires présentes dans la paroi. On peut supposer que les différences structurales, observées entre les LTAs des trois *Bacilli* probiotiques et celles *S. aureus* pathogène, pourraient être impliquées dans ces mécanismes de reconnaissance.

Le taux de substitution par la *N*-acétylglucosamine des LTAs des trois souches de *Bacillus* sont moins élevés que ceux relatifs à la D-alanine. Les LTAs de *B. cereus* ne présentent aucune substitution de la chaîne hydrophile par de la glucosamine, alors que nous avons trouvé 3% de taux de substitutions par la *N*-acétylglucosamine de la chaîne glycérol-phosphate pour les LTAs de *B. clausii* et 7% chez *B. subtilis*. L'enzyme catalysant le transfert de la *N*-acétylglucosamine depuis un β -GlcNacpolyprénol sur les LTAs, appelée β -GlcNac-P-polyprénol-synthétase pourrait être responsable des substitutions du squelette glycérol-phosphate par la *N*-acétylglucosamine. Cependant, le rôle de la *N*-acétylglucosamine reste à approfondir en raison du peu d'études s'y rapportant, et d'une focalisation de la plupart des travaux sur le rôle de la D-alanine.

En ce qui concerne l'ancre lipidique des LTAs, quelques études ont analysé la composition en acides gras (Roethlisberger *et al.* 2000; Morath *et al.* 2001; Shiraiishi *et al.* 2013). Les caractérisations structurales des LTAs ont été réalisées par spectroscopie RMN, mais cette méthode ne permet pas de déterminer la nature des chaînes acyles, notamment en raison de la micro-hétérogénéité de la composition des acides gras. La RMN ¹H n'est donc pas la méthode la mieux adaptée à l'analyse des acides gras. Aussi, afin de déterminer la nature de l'ancre lipidique avec plus de précision, ainsi que la longueur des chaînes hydrogénocarbonées, nous avons réalisé une analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) avec une source d'ionisation à impact électronique. Les résultats obtenus sont exprimés en rapport molaire de chaque acide gras par rapport phosphore présents dans les LTA purifiés (Tableau 25).

Acide gras	Rapport molaire de chaque acide gras par rapport au phosphore contenu dans les LTAs de		
	<i>B. cereus</i> CH	<i>B. subtilis</i> CU1	<i>B. clausii</i> O/C
C14:0	0,023	0	0,005
Iso- ou Antéiso-C15:0	0,088	0,134	0,130
C16:0	0,018	0,021	0,021
Iso- ou Antéiso-C16:0	0,020	0,018	0,020
C16:1	0	0	0
Iso-C17:0	0,016	0,019	0,018
Antéiso-C17:0	0,009	0,032	0,028
C18:0	0	0	0
C18:1	0	0	0

Tableau 25: Composition en acides gras des LTAs de *B. cereus* CH, *B. subtilis* CU1 et *B. clausii* O/C déterminée par GC-MS.

Les LTAs des trois souches de *Bacillus* possèdent des compositions similaires en acides gras. Ces résultats révèlent la présence d'acides gras branchés, principalement iso- et anteiso-C15:0, puis en quantités moindres C14:0, C16:0, iso- et anteiso-C16:0, iso-et anteiso-C17:0, ce qui est en accord avec les travaux de Iwasaki et coll. (1988). Ces acides gras ramifiés ont déjà été identifiés dans les membranes de certains genres bactériens incluant le genre *Bacillus* (Li *et al.* 2010).

Toutefois, la teneur de chacun des acides gras varie significativement entre les souches de *Bacillus*. En particulier, les LTAs de *B. cereus* qui présentent des quantités inférieures d'anteiso-C17:0

et supérieures en C14:0. Compte tenu du rôle, rapporté dans la littérature, de l'ancre lipidique dans la reconnaissance des LTAs par des récepteurs cellulaires (Jin *et al.* 2007), ces variations structurales pourraient être en partie à l'origine de différences d'activité biologique des LTAs, mais cette hypothèse doit être validée.

Il y a souvent eu des divergences d'interprétation concernant l'activité biologique associée aux LTAs. Des effets biologiques parfois contradictoires avaient été observés selon les études. Il s'est avéré que ces contentions étaient liées à la méthode d'extraction, qui pouvait être destructive pour les molécules (méthode au phénol à chaud), et d'autre part à la possible contamination de l'échantillon par des endotoxines telles que le LPS (Gao *et al.* 2001; Morath *et al.* 2002).

Plusieurs publications ont par la suite utilisé un test enzymatique afin de contrôler l'absence d'endotoxines dans les échantillons purifiés. Initialement, le terme « endotoxine » qualifiait le LPS des bactéries à Gram négatif qui peut facilement contaminer l'eau utilisée pour la préparation des échantillons. Le test « *Limulus amebocyte lysate* » (LAL) contient un extrait de cellules sanguines de limule, un crustacé marin dont le système immunitaire réagit très fortement à la présence de LPS. L'interaction de l'endotoxine avec une enzyme du sang de limule, appelée Facteur C, déclenche l'activité protéolytique de ce dernier. En présence d'un substrat chromogène composé de peptides de synthèse liés à de la para-nitroaniline, le facteur C va libérer, dans le milieu réactionnel, la *p*-nitroaniline, un composé jaune dont l'intensité de la coloration sera proportionnelle à l'activité du facteur C, et donc à la quantité d'endotoxine présente dans l'échantillon. Afin de vérifier l'absence de LPS contaminants, ce test a été mis en place à la fois sur nos préparations de LTAs purifiés, ainsi que sur les préparations commerciales de LPS de *Escherichia coli* K12 et des LTAs de *Staphylococcus aureus* pathogène. Un contrôle négatif a été réalisé avec de l'eau ultrapure commerciale ne contenant pas d'endotoxine. Les résultats sont présentés ci-dessous :

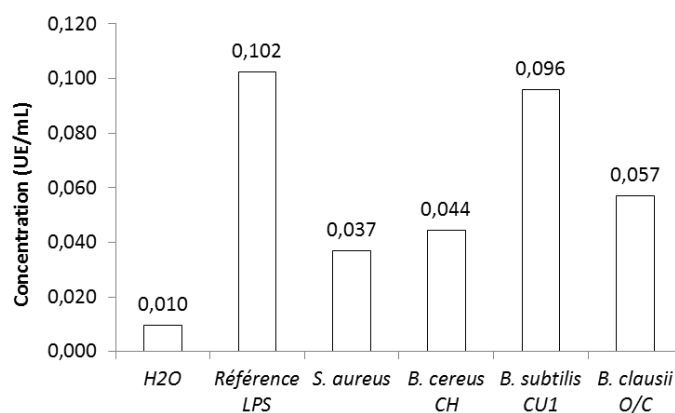


Figure 48: Concentration en endotoxines (en unités enzymatiques/mL) dans les LTAs utilisés pour cette étude. Le LPS de *Escherichia coli* est utilisé comme contrôle positif, et de l'eau ultrapure dépourvue d'endotoxine est utilisée comme contrôle négatif.

Les résultats indiquent qu'il y a présence d'endotoxines à la fois dans les LTAs commerciaux, mais également dans les LTAs extraits de *Bacillus*. On peut néanmoins remettre en cause la validité de ce test au niveau de sa spécificité pour un unique type d'endotoxine, le LPS, alors que d'autres constituants ont une structure similaire et jouent un rôle fondamental dans l'inflammation. Il semblerait qu'en réalité ce test ne soit pas spécifique du LPS, mais réagisse avec différentes endotoxines, qu'elles soient issues de bactéries à Gram positif ou bien Gram négatif.

La présence de contaminants dans les échantillons de LTAs serait directement observable lors des analyses spectroscopiques. Dans notre cas, aucune soustraction de spectre « contaminant » aux spectres obtenus RMN n'a été réalisée, confirmant la pureté des LTAs. De plus, l'analyse des acides aminés par la méthode Pico-Tag révèle que l'alanine est le seul acide aminé présent dans nos échantillon (données non-présentées) signifiant qu'il n'y a pas de protéine contaminante dans nos échantillons.

3. Détermination de l'activité biologique des LTAs purifiés

3.1. Etude de l'effet des LTAs purifiés sur la synthèse de gènes cellulaires par PCR quantitative

Les effets bénéfiques des probiotiques dépendent notamment de leur capacité à moduler la réponse du système immunitaire de l'hôte. Cependant, les mécanismes à l'origine de ces effets, et principalement ceux impliquant les composants de la paroi bactérienne, restent encore mal connus. Le potentiel des LTAs à stimuler les mécanismes de défense de l'hôte peuvent être mis en évidence par leur capacité à induire la transcription de gènes cellulaires ayant des fonctions impliquées dans les effets des bactéries probiotiques. Parmi ces gènes, on trouve les cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , ...), les cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGF- β , ...), mais également des gènes associés à la production de mucine (MUC2 et MUC13) et des gènes associés au maintien des jonctions serrées (notamment la cadhérine). Le niveau de transcription de chacun de ces gènes a été mesuré après incubation de cellules Caco-2¹ utilisées couramment comme modèle de cellules épithéliales intestinales, avec les LTAs des trois souches de *Bacillus*. Les deux contrôles positifs utilisés sont les LTAs commerciaux de *Staphylococcus aureus* pathogènes, et le LPS d'*Escherichia coli* K12. Le choix de ces contrôles positifs se justifie par le fait qu'ils sont décrits tous les deux

¹ Cellules d'adénocarcinome colorectal humain.

comme inducteurs de réactions pro-inflammatoires, cependant la transmission du signal passe par des récepteurs cellulaires distincts.

Les LTAs purifiés ainsi que le LPS sont incubés à 1 mg/mL et 10 mg/mL avec les cellules Caco-2 pendant 4 h. Les ARNs sont extraits puis rétrotranscrits en ADNc, et l'expression des gènes de l'IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, MUC2, PUC13 et de la cadhérine est déterminée par qPCR. Les résultats sont présentés Figure 49.

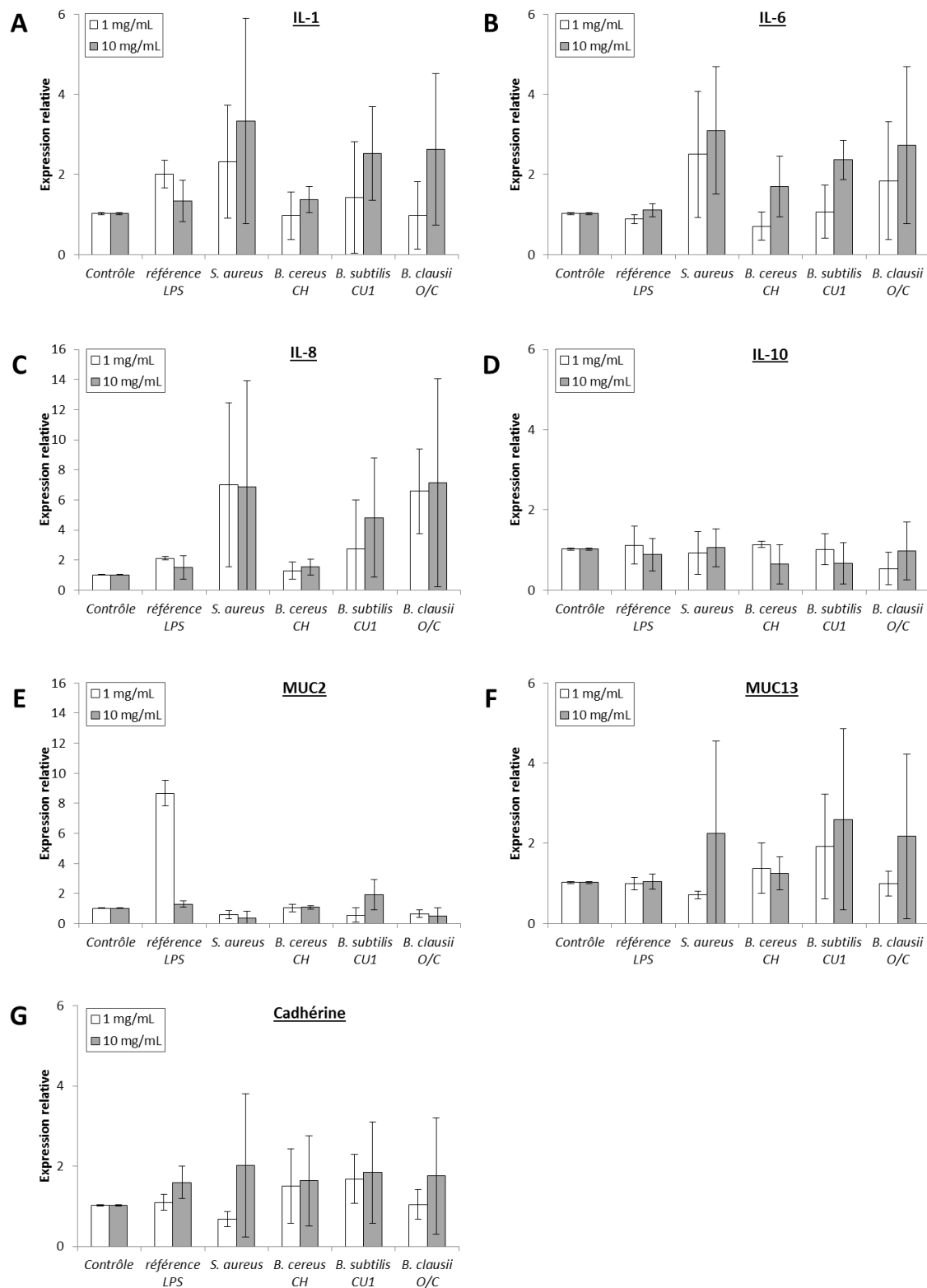


Figure 49: Etude de la transcription de gènes impliqués dans les effets probiotiques induits par les LTAs purifiés. Les taux d'expression des gènes IL-1 (A), IL-6 (B), IL-8 (C), IL-10 (D), MUC2 (E), MUC13 (F) et Cadherine (G) ont été mesurés par RT-qPCR, et sont rapportés à la condition contrôle, normalisée à un taux d'expression de 1 pour chaque réplicat. Les résultats représentent les moyennes \pm écart type de trois expériences indépendantes.

Une variation de la transcription d'un gène est considérée comme significative lorsque son taux d'expression varie d'au moins 300% par rapport au contrôle négatif. Les résultats obtenus ne sont pas significatifs, soit parce que la variation de transcription est faible, soit parce que les écarts-type ont des valeurs trop élevées. Toutefois, nous avons jugé utile de réaliser leur analyse.

Aucun des antigènes testés ne semble être impliqué dans l'expression de la cadhérine, gène impliqué dans le maintien des jonctions serrées entre les cellules épithéliales intestinales, aussi bien pour les contrôles positifs que pour les LTAs étudiés (Figure 49 G). Ces résultats sont en accord avec la littérature. En effet, les LTAs de bactéries probiotiques ne seraient pas des facteurs clés impliqués dans le développement des jonctions serrées, qui sont plutôt des protéines sécrétées (Yan *et al.* 2007).

Le contrôle positif, réalisé en présence de LPS induit la transcription d'une seule cytokine pro-inflammatoire, l'IL-1, bien qu'il soit considéré comme un antigène majeur de l'inflammation chez les bactéries à Gram négatif. Il semble également induire la transcription du gène MUC2, mais uniquement à faible concentration (1 mg/mL), tandis qu'aucun effet n'est observé sur le gène MUC13. En revanche, dans la condition avec les LTAs extraits de *S. aureus*, une forte induction de la transcription des gènes impliqués dans l'inflammation (IL-1, IL-6 et IL-8) et dans la sécrétion de mucine (MUC13 uniquement) est observable. Les propriétés pro-inflammatoires des LTAs de *S. aureus*, décrites dans la littérature, confortent les résultats obtenus dans ces expériences (Tang *et al.* 2010). Bien que les LTAs de *S. aureus* soient considérés comme de plus faibles inducteurs de la réaction pro-inflammatoire comparativement aux LPS (Kimbrell *et al.* 2008), Deininger et coll. (2008) ont observés que ces mêmes LTAs induisaient plus fortement la production d'IL-8 que le LPS, et que la conclusion inverse était observée pour l'IL-1.

De manière générale, aucun des antigènes testés ne semble induire la synthèse d'IL-10 (cytokine anti-inflammatoire), y compris le LPS d'*E.coli* et les LTAs de *S. aureus* (Figure 49 D). Ces résultats nous permettent de conclure, d'une part quant à la validité de la méthode étant donné que les LPS et les LTAs de *S. aureus* sont fortement pro-inflammatoires, et d'autre part, sur l'absence d'activité anti-inflammatoire des LTAs extraits des souches de *Bacillus* probiotique. Il est important de noter que le fait qu'il n'y ait pas d'activité inflammatoire observée sur des cellules dans un état d'inflammation basal, ne signifie pas que ces mêmes LTAs ne pourraient pas réduire l'inflammation sur des cellules dans un état inflammatoire supérieur (Kim *et al.* 2008).

Seul le LPS apparaît comme inducteur du gène MUC2, mais la réponse n'est pas dose-dépendante, ce qui reflète probablement une inhibition de la transcription de ce gène à forte concentration en LPS. Aucun des LTAs provenant des souches probiotiques n'induit de manière significative la synthèse de MUC2 ou MUC13, les écarts type sont toutefois très importants. Les LTAs ne semblent pas être impliqués dans la sécrétion de mucine.

Les LTAs extraits de la souche probiotique *B. cereus* CH n'induisent pas de manière significative la synthèse des gènes étudiés. Néanmoins, comme nous l'avons abordé précédemment, il est possible que des LTAs ayant une faible activité pro-inflammatoire comme ceux de *B. cereus*, puissent réduire l'inflammation de cellules dont l'inflammation aura été activée.

Les LTAs de *B. subtilis* CU1 et *B. clausii* O/C apparaissent, malgré d'importants écarts-type, comme de potentiels inducteurs de la transcription de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-8) mais de manière très modérée comparativement aux contrôles positifs. L'effet pro-inflammatoire d'une bactérie est intimement lié à la composition et à la structure de la surface bactérienne. Ce dernier point suggère qu'un probiotique, qui interagit avec les cellules intestinales, pourrait conduire à la sécrétion de composés pro-inflammatoires tels que des cytokines ou du NO. Etant donnée la complexité de cette paroi, il est possible qu'un effet pro-inflammatoire de la souche ne soit pas uniquement lié aux acides lipotéichoïques.

L'inflammation induite par des composés pro-inflammatoires est un processus utile pour l'activation du système immunitaire de l'hôte contre les pathogènes. Cependant, une inflammation excessive peut provoquer des pathologies inflammatoires. En effet, *S. aureus* est un pathogène commun impliqué dans ces pathologies, et ses LTAs sont de puissants inducteurs de l'inflammation (Ginsburg 2002) comme le confirment nos résultats. Les LTAs provenant des trois souches de *Bacillus* étudiées semblent être de plus faibles inducteurs de la réponse inflammatoire comparativement au LPS ou aux LTAs de *S. aureus*, ce qui suggère qu'ils pourraient stimuler le système immunitaire, mais à un niveau moindre, ne conduisant pas à niveau d'inflammation pathologique comme il peut être causé par des LTAs d'agents pathogènes. Cette hypothèse, déjà proposée pour les LTAs de *L. plantarum* (KCTC10887BP) (Kim *et al.* 2008), est étayée par le fait que les souches de *Bacillus* étudiées sont apparentées à des agents immunostimulateurs, bénéfiques pour l'hôte.

Les cellules Caco-2 sont immunotolérantes, s'expliquant par le fait que ces cellules épithéliales intestinales et coloniques ont mis en place des systèmes de régulation pour pallier leur stimulation perpétuelle par des antigènes bactériens présents dans la lumière intestinale (Melmed *et al.* 2003). Pour conforter ces résultats, une perspective serait d'incuber les LTAs des trois *Bacilli* en présence de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) et de doser les cytokines sécrétées dans le surnageant de culture par ELISA.

L'ensemble de ces résultats, bien qu'ils soient à considérer avec précaution, constitue un argument renforçant l'intérêt d'utiliser ces souches comme probiotiques étant donnée l'activité pro-inflammatoire modérée associée aux LTAs présents à leur surface.

3.2. Mesure de la production de cytokines par des PMBCs

Une analyse au niveau du transcriptome doit généralement être confortée par une analyse au niveau du protéome. Les résultats que nous avons obtenus précédemment ne suffisent pas pour conclure sur le rôle des LTAs de *Bacillus* dans l'interaction avec l'hôte et les effets bénéfiques associés, et plus particulièrement en ce qui concerne l'activité immunomodulatrice potentielle des LTAs. Les hypothèses émises précédemment doivent être validées.

Pour cela, nous nous sommes intéressés à la capacité des LTAs à induire la production de cytokines par des cellules mononucléées humaines du sang périphérique (PBMC). Contrairement aux cellules Caco-2, ces cellules ne présentent pas de tolérance acquise aux antigènes bactériens. Les cellules PBMCs sont isolées du sang de donateurs sains, et stimulées pendant 24 h avec 1 mg/mL et 10 mg/mL de LTAs extraits des trois *Bacilli*. Comme précédemment, deux contrôles positifs ont été réalisés avec des extraits commerciaux de LPS de *E. coli* et des LTA de *S. aureus*. Le contrôle négatif est réalisé avec du tampon acétate de sodium 20 mM à pH 4,7. Les concentrations en cytokines pro-inflammatoires (TNF- α et IL-8) et en cytokines anti-inflammatoires (IL-10) dans le surnageant de culture ont été déterminées par la méthode ELISA. Les résultats obtenus sont présentés Figure 50.

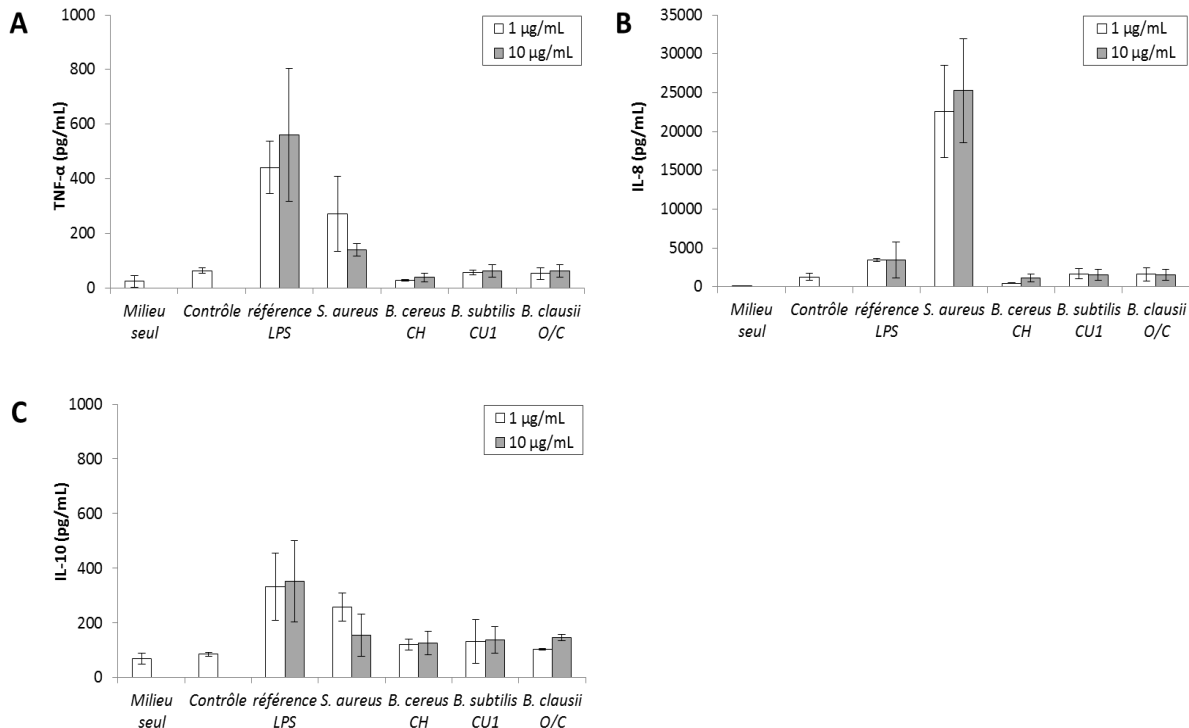


Figure 50: Production de cytokines par des PBMCs. Les concentrations en cytokines TNF- α (A), IL-8 (B) et IL-10 (C) dans le surnageant de culture ont été déterminées par la méthode ELISA. Ces résultats représentent les moyennes \pm écarts type de trois expériences indépendantes réalisées sur trois donneurs différents.

Concernant les contrôles positifs, les LTAs de *S. aureus* induisent significativement la production d'IL-8, de manière concentration dépendante, et plus significativement que ne le fait le LPS (Figure 50 B). Ce constat est en accord avec les résultats obtenus précédemment par RT-PCR. En revanche, la tendance inverse est observable pour la production de TNF- α : le LPS induit de manière plus importante la production de TNF que ne le font les LTAs de *S. aureus* (Figure 50 A). Une faible production d'IL-10 est induite par le LPS, et dans une moindre mesure par les LTAs de *S. aureus*. Ryu *et al.* (2009) avaient déjà observé une induction de la production d'IL-10 par les LTAs de *S. aureus* ATCC 6538 sur des PBMCs.

Dans notre expérience, aucun des trois LTAs extraits des souches probiotiques de *Bacillus* n'induit la production de TNF- α , d'IL-8 ou d'IL-10 de manière significative, comparativement à la condition témoin. Des résultats similaires ont été obtenus avec les LTAs de *L. plantarum* (Ryu *et al.* 2009). Ces résultats confirment que l'activité immunologique des LTAs est spécifique de la souche. Compte tenu du fait que les réponses inflammatoires ne sont pas bénéfiques pour l'hôte lorsqu'elles atteignent des niveaux trop élevés, les bactéries probiotiques possédant une activité faiblement inflammatoire, seraient bénéfiques pour la santé de l'hôte.

Les différences observées entre les activités immunomodulatrices des LTAs de pathogènes et de probiotiques sont probablement dues à des différences de structure. Les LTAs de *S. aureus* sont composés de chaînes de glycérol-phosphate avec un degré de polymérisation plus important (45 à 50) comparativement à ceux des souches de *Bacillus*, ce qui pourrait expliquer une reconnaissance différente par les récepteurs (Morath *et al.* 2005). Deininger *et coll.* (2007) ont montré, en réalisant la synthèse chimique de LTAs de type I, que plus la longueur de la chaîne de glycérol phosphate est importante, plus la production de cytokines pro-inflammatoire (IL-8 et TNF- α) est élevée.

Un taux de substitution différent par la D-alanine pourrait également être à l'origine de telles différences. Bien que cela soit parfois contredit, plusieurs études semblent démontrer le rôle clé du taux de substitution des LTAs par la D-alanine, aussi bien sur des LTAs isolés qu'*in situ* dans la paroi bactérienne. En effet, Morath *et coll.* (2001) ont montré qu'une hydrolyse complète et spécifique des liaisons esters des résidus D-alanine de LTAs purifiés de *S. aureus* conduit à la réduction drastique de leur activité immunologique sur du sang humain total. Ce rôle déterminant a également été mis en évidence en remplaçant la D-alanine par la L-alanine. Cette modification réduit d'un facteur 10 l'activité immunologique sur des cellules du sang total (Deininger *et al.* 2003). Une étude réalisée par Grangette *et al.* (2005) a permis de confirmer le rôle de la D-alanine dans l'activité biologique des LTAs *in situ* dans la bactérie. L'approche expérimentale a consisté en la production d'un mutant de *Lactobacillus plantarum* NCIMB8826 pour lequel le processus d'incorporation de la D-alanine avait été bloqué. L'incubation de la souche mutante avec des PBMCs conduit à une réduction de la

sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comparativement à la souche sauvage, et à une augmentation de la sécrétion de la cytokine anti-inflammatoire (IL-10).

Les PBMCs sont utilisées comme modèle pour étudier la réaction immunitaire en réponse à un antigène. Toutefois, les PBMCs ne sont pas les principales cellules cibles de l'interaction probiotiques-hôte. Les macrophages et les cellules dendritiques présentes dans la *lamina propria* sont susceptibles d'interagir directement avec les composants de la paroi bactérienne.

3.3. Mesure de la production de NO par des cellules RAW 264.7

La production de monoxyde d'azote (NO) est une caractéristique essentielle de nombreuses cellules immunitaires, y compris des cellules dendritiques, des cellules NK, des mastocytes et des macrophages, qui reconnaissent des MAMPs, comme par exemple le LPS ou les LTA, via leurs PRRs. Il a été démontré que le NO pouvait avoir diverses fonctions biologiques. Il est considéré comme l'un des acteurs les plus polyvalents du système immunitaire. Le NO peut induire un effet anti-inflammatoire dans des conditions normales et physiologiques. Cependant, lors de sa surproduction, il est considéré comme un médiateur pro-inflammatoire, capable d'induire l'inflammation dans des situations anormales. La production d'importantes quantités de NO par la NO synthase inductible (iNOS) est impliquée dans la mise en place des chocs septiques, notamment lors de contacts avec des composants bactériens comme le LPS. La capacité des LTAs à augmenter les mécanismes immunitaires de défense de l'hôte a été démontrée par leur capacité à moduler la biosynthèse de NO, sur différents modèles cellulaires comme les cellules dendritiques ou les macrophages de souris RAW 264.7 principalement (Hsiao *et al.* 2004; Boveri *et al.* 2006; Kimbrell *et al.* 2008; Ryu *et al.* 2009; Zidek *et al.* 2010).

Nous avons étudié la capacité des LTAs extraits des souches de *Bacillus* probiotiques à induire des mécanismes de défense immunitaire en testant leur capacité à augmenter la production de NO. Les cellules RAW 264.7 ont été incubées avec chacun des LTAs purifiés, à trois concentrations différentes (0,1, 1 et 10 µg/ml) pendant 48 h.

L'accumulation des nitrites a été déterminée comme indicateur de la production de NO (Kang *et al.* 2011). La viabilité des cellules après le traitement a été contrôlée par un dosage MTT, et aucune cytotoxicité n'a été observée (données non présentées). Le LPS commercial d'*E. coli* K12 et les LTAs provenant de *S. aureus* ont été utilisés comme témoins positifs aux mêmes concentrations que les LTAs de *Bacillus*. Afin d'établir une corrélation rigoureuse entre la structure et l'activité, ces essais

biologiques ont été réalisés avec les LTAs précédemment caractérisés par RMN ^1H et GC-MS. Les résultats obtenus sont présentés Figure 51.

Afin de confirmer l'effet des LTAs purifiés sur la synthèse de NO, la même expérience est réalisée en présence d'un inhibiteur chimique stéréo-spécifique de la iNOS, le L-NAME. Cet inhibiteur est préincubé avec les cellules RAW 264.7, à une concentration de 10 mM pendant 1 h avant incubation avec les différentes molécules. Aucune production de NO en présence de L-NAME n'a été observée quelle que soit la condition (résultats non présentés).

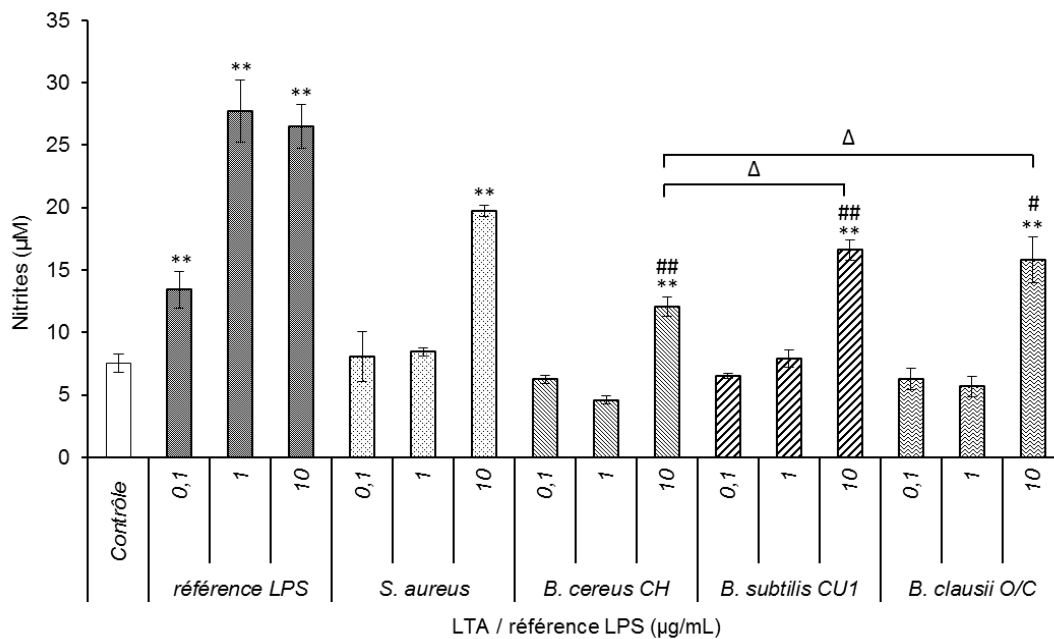


Figure 51: Production de nitrites comme indicateurs de l'inflammation par les cellules RAW 264.7 après 48 h d'incubation avec les LTAs extraits des trois *Bacilli* probiotiques, à 0,1, 1 et 10 µg/mL. Les résultats représentent la moyenne \pm écart type de trois expériences indépendantes. $^*p < 0,05$; $^{**}p < 0,01$ comparativement au contrôle; $^{\Delta}p < 0,05$ comparativement aux LTAs de *B. cereus* à 10 µg/mL; $^{\#}p < 0,05$ comparativement aux LTAs de *S. aureus* commerciaux à 10 µg/mL.

La production de NO, en présence des LTAs de *Bacillus* ou de *S. aureus* à 0,1 µg/mL et 1 µg/mL, est similaire à celle obtenue pour la condition contrôle. Toutefois, à la même concentration, le LPS semble être un fort inducteur de la production de NO. À 0,1 µg/ml, la production de NO induite par le LPS est environ deux fois supérieure à celle de la condition contrôle, et près de trois fois supérieure lorsque sa concentration est de 1 µg/mL. Ces résultats sont en accord avec une précédente étude rapportant que le LPS est plus immunostimulateur que les LTAs sur les macrophages murins RAW 264.7 (Kimbrell *et al.* 2008). Les LTAs de *S. aureus* et des *Bacilli* induisent une production de NO deux fois plus importante à la concentration de 10 µg/ml comparativement à ce qui est observé

aux concentrations plus faibles. Cela suppose que l'augmentation de la concentration en NO par rapport au contrôle ne devient significative qu'à des concentrations supérieures à 10 µg/mL de LTAs.

La production de NO, observée avec les LTAs de *B. subtilis*, *B. clausii*, et *B. cereus* est significativement inférieure à celle obtenus avec les LTAs de *S. aureus* à 10 µg/mL. En revanche, les LTAs de *B. subtilis* et *B. clausii* induisent une production de NO significative par rapport au contrôle. Les LTAs de *B. cereus* ont un effet inflammatoire moindre à la même concentration.

Nous pourrions faire l'hypothèse que ces différences de propriétés immunomodulatrices de chaque LTA dépendent directement de leur structure. En effet, l'analyse structurale a révélé que la composition de l'ancre lipidique des LTAs de *B. cereus* est significativement différente de celles de *B. subtilis* et de *B. clausii*. Il a été rapporté dans plusieurs études que les chaînes acyle des acides gras joueraient un rôle important dans la réponse immunitaire induite par les LTAs de bactéries pathogènes et probiotiques, compte tenu de leur implication dans la reconnaissance par les récepteurs cellulaires (Morath *et al.* 2002; Han *et al.* 2003; Baron et Kasper 2005). Bien que les LTAs de *S. pneumoniae* et *S. aureus* soient d'un point de vue structural très différents, ils ont tous les deux été décrits comme des ligands du TLR2. Les LTAs de pneumocoques, dont les glycolipides possèdent des acides gras insaturés, ont montré une stimulation des TLRs cent fois moins importante que les LTAs de staphylocoques, constitués d'acides gras saturés (Han *et al.* 2003). Si la reconnaissance des LTAs par le TLR2 est actuellement discutée (Fischer *et al.* 2011; Schmidt *et al.* 2011; Dammermann *et al.* 2013; Ray *et al.* 2013), il est plausible que dans notre étude, le faible effet immunomodulateur des LTAs de *B. cereus* soit en partie lié à la nature de la chaîne acyle.

De plus, le taux de substitution des LTAs de *B. cereus* par la D-alanine est le plus élevé parmi les trois souches étudiées (41%), alors qu'ils apparaissent comme les LTAs les moins immunostimulants. Les LTAs provenant de *B. subtilis* et de *B. clausii*, avec des taux de substitution par la D-alanine de 17% et 3% respectivement, induisent une production de NO supérieure. Ces résultats indiquent qu'il n'y a pas de corrélation proportionnelle entre le taux de substitution de D-alanine et la production de NO. Les LTAs de *S. aureus* ont été décrits comme ayant un taux de D-alanylation d'environ 70%, avec un potentiel immunostimulant important. Néanmoins, les résultats obtenus concernant la structure et l'activité des LTAs de *Bacillus* n'ont pas démontré qu'un plus haut taux de substitution par l'alanine signifiait une activité immunostimulatrice plus importante.

Des études antérieures ont montré que les LTAs de bactéries probiotiques qui induisaient la production de NO, mais dans des quantités moindres à celles induites par le LPS, possédaient un potentiel inflammatoire (Ryu *et al.* 2009). Les LTAs des trois souches étudiées pourraient avoir ces mêmes propriétés, ce qui n'est pas incompatible avec une activité probiotique. En effet, il existe deux types distincts d'effets immunomodulateurs associés à la consommation de probiotiques, qui

dépendent directement de la santé des patients (Heyman et Heuvelin 2006). La première est la capacité des probiotiques à réduire l'inflammation chez des patients atteints de maladies inflammatoires de l'intestin, et le second concept repose sur la capacité des probiotiques à engendrer un effet immunostimulant sur des individus sains. Ce dernier point suggère qu'un probiotique, qui interagirait avec les cellules intestinales, pourrait conduire à la sécrétion de composés pro-inflammatoires tels que des cytokines ou du NO. L'inflammation induite par ces composés pro-inflammatoires est un procédé utile dans l'activation du système immunitaire de l'hôte contre les microbes pathogènes. Cependant, une inflammation excessive peut être à l'origine de maladies inflammatoires sévères (maladie de Crohn, colite ulcéreuse,...). *S. aureus* est un pathogène impliqué dans ce type de pathologies, et les LTAs présents dans sa paroi sont de puissants inducteurs de l'inflammation (Ginsburg 2002). Les LTAs provenant des trois souches de *Bacillus* sont de plus faibles inducteurs de la production de NO comparativement aux LPS ou aux LTAs de *S. aureus*. Ceci suppose qu'ils puissent stimuler le système immunitaire, sans conduire toutefois à un niveau d'inflammation pathologique, comme il pourrait être provoqué par les LTAs d'agents pathogènes. Cette hypothèse, déjà proposée pour les LTAs de *L. plantarum* (KCTC10887BP) (Kim *et al.* 2008), est soutenue par le fait que les souches de *Bacillus* étudiées sont décrites comme étant des stimulateurs immunitaires bénéfiques. L'ensemble de ces résultats soulèvent la question de l'implication de la D-alanine dans l'activité biologique des LTAs.

4. Rôle de la D-alanine dans l'activité immunologique des LTAs

Un traitement ayant pour objectif d'éliminer les esters de D-alanine pourrait cependant conduire à l'hydrolyse de tous les substituants liés par liaisons esters aux LTAs (Gisch *et al.* 2013). Une précédente étude de la relation structure/activité, réalisée sur des LTAs partiellement dégradés, a tenté de mettre en évidence des caractéristiques structurales impliquées dans l'activité biologique des LTAs. Cependant, ces modifications chimiques de la structure ne sont pas toujours spécifiques, et nécessitent une caractérisation spectroscopique afin de confirmer l'efficacité et la spécificité de la modification induite.

4.1. Caractérisation structurale des LTAs déalanylés

Chacun des LTAs extraits de *Bacillus* a été traité à pH 8,5 pendant 24 h et à 37°C (Morath *et al.* 2001), afin d'engendrer l'hydrolyse des esters de D-alanine. Cette hydrolyse a été réalisée sur les

mêmes extraits que ceux utilisés dans la section précédente, afin de pouvoir corrélérer les résultats entre eux. La spécificité de l'hydrolyse a été contrôlée par RMN ^1H . Les spectres obtenus permettent de mettre en évidence la perte spécifique des signaux des ester de D-alanine à $\delta = 1.64$ ppm et à $\delta = 4.30$ ppm (Figure 52).

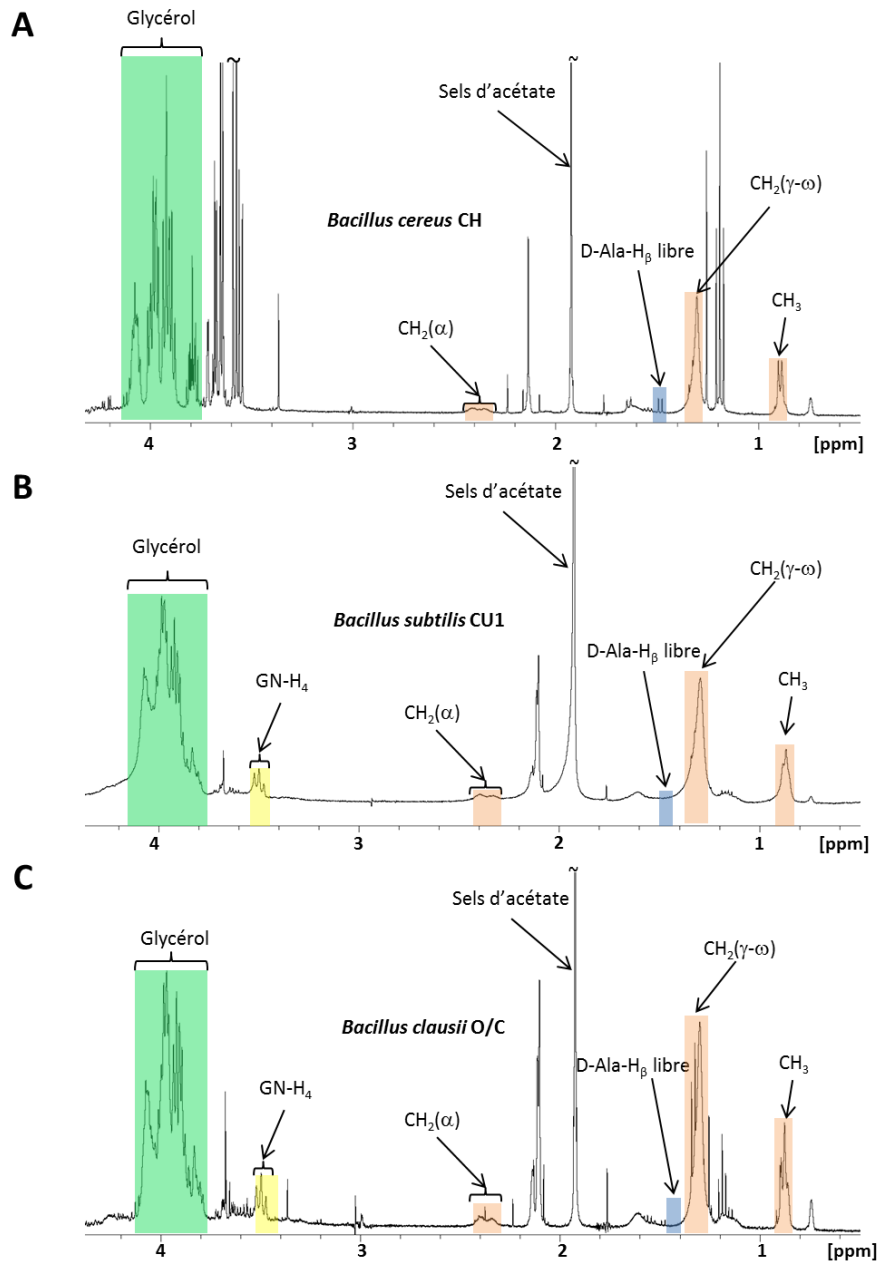


Figure 52: Spectres RMN ^1H des LTAs déalanylés de (A) *B. cereus* CH, (B) *B. subtilis* CU1 et (C) *B. clausii* O/C.

La composition chimique des LTAs déalanylés, déterminée à partir des spectres RMN ^1H , est présentée dans le Tableau 26.

	<i>B. cereus</i> CH	<i>B. subtilis</i> CU1	<i>B. clausii</i> O/C
Nombre d'unités glycérol-phosphate (n)	20	25	16
Taux de substitution par la D-alanine	1%	0%	0%
Taux de substitution par la <i>N</i> -acetylglucosamine	0%	7%	4%

Tableau 26: Analyse structurale des LTAs de *B. cereus* CH, *B. subtilis* CU1, et *B. clausii* O/C par RMN ¹H après déalanylation.

Les résultats obtenus concernant l'analyse des LTAs déalanylés par RMN ¹H montrent que les substitutions par la D-alanine ont été éliminées de manière effective de la chaîne hydrophile, sans que le taux de substitution par la *N*-acetylglucosamine n'ait été modifié (Tableau 26). Les spectres RMN ¹H indiquent également que l'ancre lipidique n'a pas été affectée par le traitement faiblement alcalin ($\delta = 1,30$ et $2,35$ ppm). Nous pouvons constater que la longueur de la chaîne hydrophile a cependant été modifiée lors de l'hydrolyse. Une diminution du nombre d'unités glycérol-phosphate est constatée lors de l'analyse. Il est possible que la micro-hétérogénéité de l'échantillon soit à l'origine de ces différences entre LTAs natifs et LTAs déalanylés, car si les liaisons esters, autres que celles de D-alanine, n'ont pas été hydrolysées, il est peu probable que le traitement à pH 8,5 ait modifié la longueur de la chaîne glycérol-phosphate.

4.2. Détermination de la production de NO par les LTAs déalanylés sur cellules RAW 264.7

Les résultats obtenus précédemment sur les cellules de macrophages murins RAW 264.7 ont permis de mettre en évidence des différences d'activité immunomodulatrice entre les LTAs extraits des trois souches de *Bacillus*. Nous allons déterminer l'impact de la déalanylation des LTAs sur l'induction de la production de NO par les cellules RAW 264.7. Pour cela, les cellules RAW 264.7 ont été incubées avec les LTAs natifs et déalanylés à raison de 10 $\mu\text{g/mL}$ pendant 48 h, et la production de nitrites a été déterminée comme cela a été décrit précédemment (Figure 53).

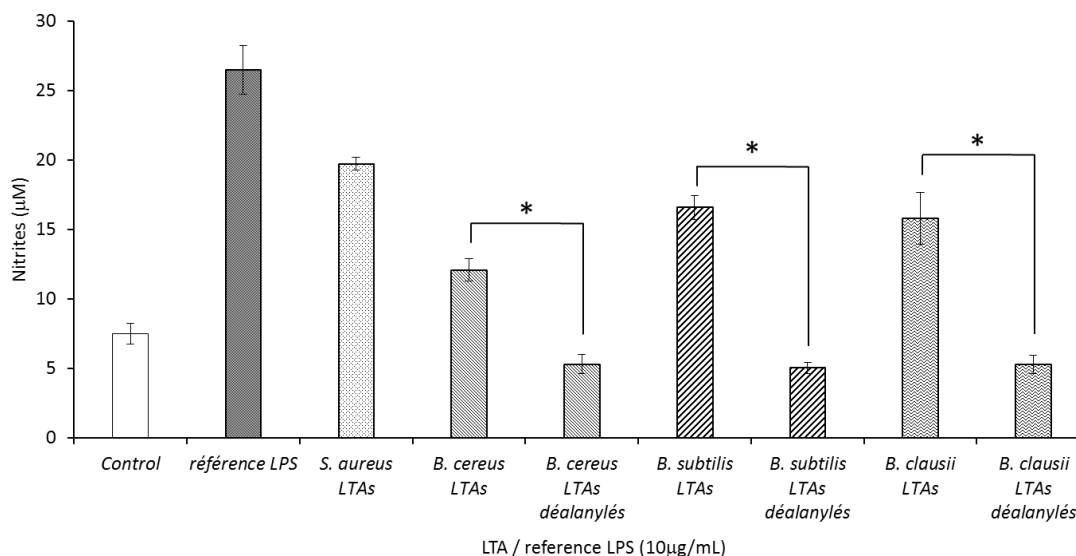


Figure 53: Production de nitrites comme indicateur de l'inflammation par les cellules RAW 264.7 après 48 h d'incubation avec les LTAs natifs et déalanylés à 10 µg/mL. Les résultats représentent la moyenne ± écart type de trois expériences indépendantes. * $p < 0,01$.

Les résultats indiquent que la déalanylation a complètement annulé le potentiel immunostimulant des LTAs, et ceci quelle que soit la souche de *Bacillus*. Malgré le rôle controversé de la D-alanine décrit dans des études antérieures (Cot *et al.* 2011), nos résultats montrent qu'un taux de substitution minimum par la D-alanine est fondamental pour l'activité biologique des LTAs, mais qu'au-delà de ce taux minimum, le nombre de substitution n'est pas directement proportionnel à la production de NO.

Plusieurs hypothèses doivent être envisagées concernant le rôle potentiel de la D-alanine dans l'activité immunologique des LTAs. A un pH voisin de 7, des groupements amines primaires et les phosphates des squelettes hydrophiles sont respectivement cationiques et anioniques. Une précédente analyse RMN ^{31}P des LTAs de *L. fermentum* NCTC 6375 a montré que le pic du phosphore présente deux pics supplémentaires, en plus de la résonance primaire, ce qui semblait provenir de l'appariement d'ions entre la fonction amine des résidus D-alanyle et les deux groupements phosphodiester anioniques adjacents (Batley *et al.* 1987; Neuhaus et Baddiley 2003). Deux modèles tridimensionnels ont été proposés (Neuhaus et Baddiley 2003) avec une énergie libre réduite au minimum : un modèle dans lequel le groupement amine protoné forme des liaisons ioniques avec le phosphodiester amont, et un autre vers le phosphodiester aval de la chaîne. Ces interactions moléculaires conduisent à une diminution de la charge nette des LTAs et à une augmentation des propriétés hydrophobes des LTAs, ce qui pourrait causer des repliements intramoléculaires (Figure 54).

Mais comme cela a été observé précédemment par Garimella et coll. (2009), ce modèle n'est pas en accord avec les données expérimentales. En effet, la présence de peptides antimicrobiens cationiques dans le milieu de culture de bactéries à Gram positif conduirait à une augmentation du taux de substitution des chaînes hydrophyles des LTAs par la D-alanine. La présence de D-alanine dans la paroi cellulaire des bactéries à Gram-positif permettrait à celles-ci d'acquérir une résistance à des peptides antimicrobiens cationiques, par des mécanismes de répulsion (Peschel 2002). Nous émettons l'hypothèse que des liaisons ioniques créées entre certaines fonctions amines primaires des résidus D-alanine, et des phosphates anioniques non-adjacents, pourraient induire d'autres conformations tridimensionnelles (Figure 54).

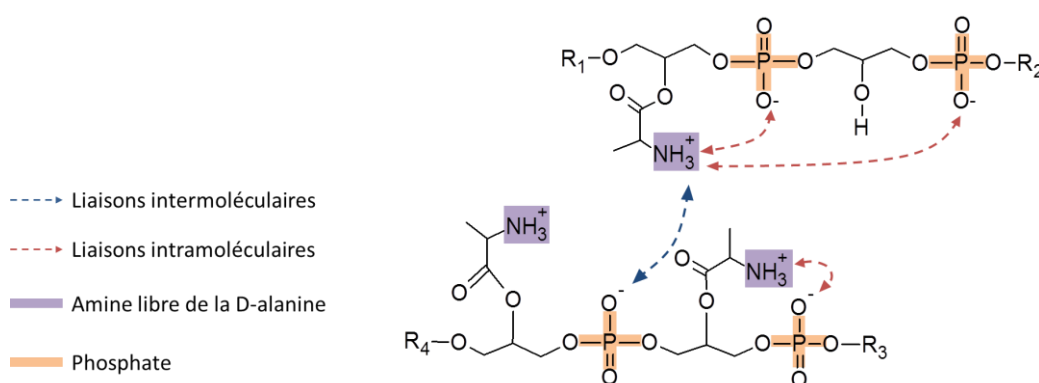


Figure 54: Interactions inter- et intramoléculaires supposées à pH 7 dans la chaîne hydrophile des LTAs.

Ces deux repliements intramoléculaires potentiels limitent les interactions intermoléculaires entre les LTAs, et pourraient changer radicalement leur activité biologique. Il est important de tenir compte du fait que différentes conformations spatiales ne sont pas reconnues de la même manière par les récepteurs, ce qui pourrait conduire à des réponses biologiques différentes par les cellules cibles. En effet, ces différences dans la composition chimique de LTAs, signifiant des propriétés physico-chimiques différentes, peuvent modifier leur capacité à interagir avec les sites de liaison au récepteur. Une étude de 1996, menée sur l'interaction entre LTAs et les « Scavenger Receptor » des macrophages, mettait en évidence qu'une compensation partielle des charges négatives de la chaîne hydrophile par des résidus D-alanine, diminue l'affinité pour le récepteur (Greenberg *et al.* 1996). Une plus grande densité de charges négatives sur les LTAs joue probablement un rôle important dans l'affinité pour les PRRs, mais notre étude montre que ce n'est pas ce qui est à l'origine de leur activité biologique.

Nilsen et coll. (2008) ont démontré, dans le cas d'une reconnaissance par le TLR2, que le blocage des co-récepteurs CD36 ou CD14 inhibe la liaison des LTAs purifiés avec les monocytes, ce qui confirme le rôle clé des co-récepteurs dans l'activité biologique des LTAs. D'après ces résultats, on

pourrait supposer que l'ancre lipidique des LTAs est probablement reconnue par le TLR2, mais que c'est la chaîne hydrophile qui pourrait être impliquée dans l'hétérodimérisation avec le TLR6, et/ou le recrutement de co-récepteurs tels que le CD36 ou CD14.

Ces observations sont valables dans le cas de molécules isolées. Cependant, on suppose qu'en solution, la multimérisation entre deux ou plusieurs molécules de LTA serait possible. Les groupements amine protonés du squelette hydrophile des LTA pourraient former des liaisons ioniques avec les phosphodiesteres d'autres molécules de LTAs (Figure 54), conduisant à l'agrégation des chaînes hydrophiles et éventuellement à des arrangements micellaires (Fischer 1997). On peut aisément supposer que la dimérisation des LTAs peut augmenter leur activité biologique. Il est également possible que les chaînes hydrophiles de différentes molécules de LTAs, soumises à des liaisons ioniques intramoléculaires, puissent interagir entre elles par effet hydrophobe. Dans ce cas, cela conduirait à d'autres possibilités d'interactions intermoléculaires, et donc à d'autres structures tridimensionnelles.

Conclusion & perspectives

Les résultats obtenus lors de cette étude ont permis de mettre en évidence la diversité de structure des LTAs, d'une part entre les genres bactériens, mais également au sein même du genre *Bacillus*. Cette diversité structurale inter-espèce concerne principalement la longueur de la chaîne glycérol-phosphate et son taux de substitution par la D-alanine. Nos résultats confirment le rôle clé attribué aux substitutions par la D-alanine, mais ils révèlent également l'absence de corrélation proportionnelle entre le taux de substitution par la D-alanine et l'activité inflammatoire des LTAs. La diversité structurale observée entre les LTAs des trois espèces de *Bacillus* peut se traduire par des conformations tridimensionnelles différentes. Ces dernières pourraient être à l'origine d'une modulation de la reconnaissance des LTAs par les récepteurs spécifiques, ce qui serait susceptible de se traduire par la modulation de l'activité biologique associée à ces constituants de la paroi bactérienne.

La compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans l'interaction bactérie probiotique-hôte est aussi nécessaire que difficile à explorer. Nos travaux se sont orientés vers l'étude de la relation structure-activité des LTAs sous forme libre, c'est-à-dire extraits de la paroi. Bien qu'une partie des LTAs puisse être retrouvée sous forme libre dans l'environnement bactérien, la part majoritaire est présente, *in situ*, associée à la paroi bactérienne. Compte tenu de la complexité de la composition moléculaire de la paroi, la mise en évidence du rôle de ces constituants dans l'activité biologique peut être abordée de deux manières différentes : par mutation d'un des gènes codant pour le constituant, dans le cas où ce gène n'est impliqué dans aucune autre fonction, ce qui n'est pas vérifié pour les LTAs. Par analyse des propriétés biologiques de l'entité moléculaire isolée. Cette deuxième stratégie, qui a été adoptée lors de nos travaux, a permis d'identifier spécifiquement l'activité de ces molécules. Toutefois, cela soulève plusieurs questions qui ont été évoquées précédemment, et qui nécessitent une investigation supplémentaire.

Tout d'abord, l'étude de la conformation spatiale des LTAs, ainsi que les interactions entre LTAs et PRRs est fondamentale pour la compréhension de leur rôle dans la relation avec l'hôte. Les différents arrangements tridimensionnels pourraient être étudiés par des calculs théoriques de dynamique moléculaire, en faisant varier le taux de substitution par la D-alanine, et le nombre de monomères glycérol-phosphate, afin de déterminer un modèle d'interaction.

Plusieurs équipes ont essayé de mettre en évidence l'interaction des LTAs avec les récepteurs de la famille des Toll-Like et la localisation subcellulaire des LTAs par des techniques de microscopie confocale (Triantafilou *et al.* 2004; Nilsen *et al.* 2008). Ces études utilisent différentes méthodes pour suivre la localisation subcellulaire des LTAs : soit par marquage direct des LTAs extraits, par un

fluorophore (Sulforhodamine ou Fluorescéine), soit par un anticorps couplé à un fluorophore et dirigé contre les LTAs. Les résultats n'apportent pas une réponse claire sur la localisation subcellulaire des LTAs. En effet, selon les modèles cellulaires utilisés (monocytes, fibroblastes,...), il a été montré que les LTAs peuvent être localisés au niveau de structures membranaires riches en cholestérol appelées radeaux lipidiques (ou lipid rafts), au niveau de l'appareil de Golgi ou du réticulum endoplasmique. Cependant, ces expériences ont été réalisées avec des LTAs extraits de *Staphylococcus aureus*, dont il a été démontré que la structure diffère de celle des LTAs extraits des trois souches probiotiques de *Bacillus* utilisées au cours de nos travaux. Il est important d'étudier les interactions des LTAs extraits de souches probiotiques avec des modèles cellulaires représentatifs des cellules du tractus intestinal. Nous avons initié l'étude de la localisation subcellulaire des LTAs extraits des trois *Bacilli* sur cellules d'adénocarcinome de côlon Caco-2. Nous avons réalisé un marquage direct des LTAs au niveau des fonctions amines libres des résidus D-alanine par la fluorescamine (Figure 55).

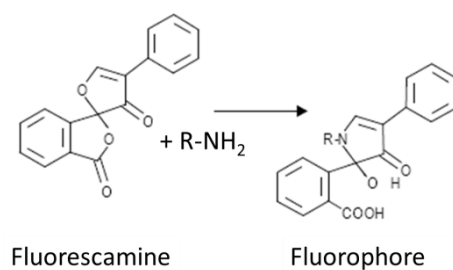


Figure 55: Schéma réactionnel du marquage des fonctions amines libres des LTAs par la fluorescamine.

Les LTAs couplés à la fluorescamine ont été incubés en présence des cellules Caco-2. Des résultats préliminaires indiquent une localisation subcellulaire de LTAs au niveau de l'appareil de Golgi et des mitochondries (Figure 56).

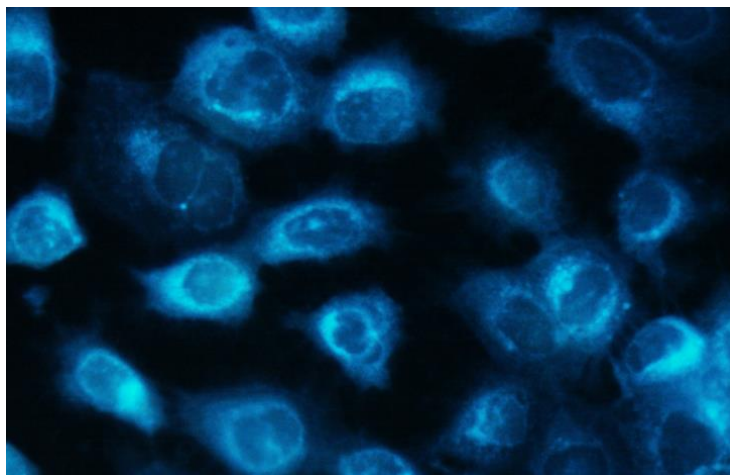


Figure 56: Distribution subcellulaire des LTAs marqués de *B. subtilis* CU1 et incubés sur cellules Caco-2.
30 μg de LTAs sont marqués avec une solution de fluorescamine à 30 mg/mL pendant 15 min à température ambiante. Les LTAs marqués sont dilués à 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans du milieu de culture et incubés 45 min avec les cellules Caco-2. La visualisation est réalisée par microscopie confocale ($\lambda_{\text{ex}} = 390 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 475 \text{ nm}$).

Cependant, la stabilité des résidus de D-alanine et le fait que la fonction amine protonée de la D-alanine soit susceptible d'être impliquée dans la conformation spatiale de la molécule, ne nous permet pas de conclure quant à la localisation subcellulaire des LTAs au niveau d'un organe cellulaire de manière spécifique. Il serait nécessaire de mener des expérimentations supplémentaires afin de marquer spécifiquement les LTAs, par des techniques qui n'impliquent pas les résidus de D-alanine.

Le rôle de la D-alanine dans l'activité immunomodulatrice a été étudié pour des LTAs issus de bactéries probiotiques et de souches pathogènes telles que *Staphylococcus aureus*. Une étude complémentaire sur le rôle potentiel des substitutions par la N-acétylglucosamine dans la chaîne glycérol-phosphate serait à envisager. Comme évoqué pour la D-alanine, le taux de substitution par la N-acétylglucosamine est susceptible d'être impliqué dans les propriétés physico-chimiques des LTAs. Le rapport entre le taux de substitution par la N-acétylglucosamine, et le taux de substitution par la D-alanine pourrait fortement influencer l'activité biologique de la molécule. Pour cela, il serait envisageable d'hydrolyser spécifiquement la liaison entre le carbone 2 du glycérol et les résidus N-acétylglucosamine, mais la méthode reste toutefois à déterminer. De même, il serait possible de réaliser une étude similaire sur le rôle de l'ancre hydrophobe dans l'interaction des LTAs de *Bacillus* probiotique avec les récepteurs. Dans la littérature, Baik et coll. (2011) ont réalisé une hydrolyse chimique à pH 12 de l'ancre hydrophobe, avec une solution d'hydroxyde de calcium. Toutefois, cette réaction est non-spécifique, elle affecte également les esters de D-alanine. Une hydrolyse spécifique de l'ancre hydrophobe, qui n'affecterait pas les résidus D-alanine et/ou N-acétylglucosamine permettrait de mettre en évidence le rôle de l'ancre lipidique dans l'interaction avec les cellules. Des

expériences pourraient être menées avec des cellules modèles du tractus intestinal afin de statuer sur le rôle des différentes sous-parties des LTAs (résidus de D-alanine, de *N*-acétylglucosamine et ancre lipidique).

D'autres travaux ont été consacrés à l'étude de l'incidence de la structure des LTAs, *in situ* dans la paroi bactérienne, sur l'interaction avec les cellules de l'hôte. Ces travaux visent à affecter les substitutions de la chaîne glycérol-phosphate par la D-alanine. Ils nécessitent une mutation de l'opéron *dlt*, plus particulièrement du gène *dltA* responsable de la D-alanylation des LTAs. Une mutation de ce gène modifie la capacité d'adhésion des souches aux cellules, ainsi que leur activité immunomodulatrice (Grangette *et al.* 2005; Wobser *et al.* 2014). La mise en place de cette stratégie serait envisagée à plus long terme sur les LTAs des trois *Bacilli*. Toutefois, la mutation du gène *dltA* influence aussi la D-alanylation des acides teichoïques, et modifie fortement la structure de la paroi. Cette approche permettrait d'établir une corrélation entre le rôle de la structure des LTAs dans leur activité biologique qu'ils soient à l'état libre, ou associés à la paroi. L'étude réalisée par Grangette et coll. (2005) a mis en évidence une augmentation de l'activité anti-inflammatoire de la souche de *L. plantarum* dont le gène *dltA* a été muté. Cette observation suppose que l'administration de souches probiotiques dont la structure des LTAs a été modifiée pourrait permettre de diminuer les processus inflammatoires chez des patients souffrant de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin par exemple.

Les résultats obtenus au cours de ces travaux ont été publiés dans le journal *Antonie van Leeuwenhoek* 106(4):693-706: « Characterization of lipoteichoic acid structures from three probiotic *Bacillus* strains : involvement of D-alanine in their biological activity » (2014).

Conclusion générale

Les bactéries probiotiques font actuellement l'objet d'enjeux économiques importants. Leur mise en œuvre dans des préparations, associées ou non à des oligosaccharides prébiotiques, a pris un essor considérable ces dernières années. Afin de manifester leurs effets bénéfiques, les probiotiques doivent survivre et séjourner dans le tractus intestinal, et interagir avec les cellules de l'hôte. Chez le genre *Bacillus*, les souches probiotiques sont incluses dans les préparations sous forme de spores, une forme bactérienne résistante notamment aux conditions extrêmes dans l'estomac. Le développement ultérieur de la souche dans l'intestin dépendra de sa capacité à repasser sous forme végétative une fois la barrière stomacale franchie. Pour cela, les conditions du milieu devront être optimales pour la souche, notamment d'un point de vue nutritionnel.

Dans ce contexte, l'étude présentée a consisté, dans un premier temps, à faire l'investigation *in vitro* de l'effet d'un oligosaccharide prébiotique de type isomaltooligosaccharide sur la croissance et le développement de la souche probiotique *B. subtilis* CU1. La capacité de la souche à utiliser ce substrat carboné a été caractérisée en milieu minimum. La sécrétion par la bactérie d'une glycohydrolase extracellulaire permettrait l'hydrolyse des IMOS en oses de plus petits DP, a été caractérisé. Une analyse, par électrophorèse bidimensionnelle, a été initiée afin de mettre en évidence des variations métaboliques spécifiques de l'utilisation de la source carbonée IMOS, ainsi que leur impact sur de potentiels marqueurs d'intérêt probiotiques exprimés par la souche dans de telles conditions. A l'heure actuelle, soixante-neuf variants ont été détectés, leur identification par spectrométrie de masse est actuellement en cours d'achèvement. Une modification de la structure de polymères de la paroi bactérienne, les acides lipotéichoïques, a été observée en présence d'IMOS. En revanche, aucune augmentation de la capacité d'adhésion de la souche à un modèle de cellules épithéliales intestinales en présence d'IMOS n'a été mise en évidence. Néanmoins, nos résultats montrent qu'en présence de bile, la capacité de la souche à germer et à croître est favorisée lorsque les IMOS constituent le substrat carboné. La résistance à la bile est nécessaire pour les bactéries probiotiques. Les souches doivent pour cela mettre en œuvre des mécanismes énergie-dépendants, bien caractérisés chez le genre *Bifidobacterium*, mais encore mal connus chez *Bacillus*. Les résultats acquis au cours de nos travaux laissent supposer qu'en présence de bile, l'utilisation des IMOS par *B. subtilis* CU1 permet de meilleurs rendements énergétiques, favorisant ainsi les mécanismes de détoxification. Ces résultats, bien qu'encourageants, ne permettent pas de conclure quant à la validité *in vivo* de nos expériences. Dans l'intestin, le milieu est très complexe, l'influence des bactéries du microbiote, des enzymes intestinales et des conditions qui y règnent, seraient susceptibles de modifier le comportement du

synbiotique. Ces résultats constituent une étude *in vitro* préliminaire d'une association synbiotique, qui devra être développée notamment lors d'une étude *in vivo* sur souris.

Une seconde partie de ce manuscrit est consacrée à l'étude de la relation structure-activité des acides lipotéichoïques de trois souches de *Bacillus* probiotique, polymères de surface potentiellement impliqués dans l'interaction de la bactérie avec les cellules de l'hôte. Cette interaction est notamment à l'origine d'effets immunomodulateurs. Les mécanismes moléculaires sont à l'heure actuelle mal connus, alors que leur compréhension serait nécessaire à l'optimisation de l'utilisation des probiotiques. Pour cela, les LTAs de trois souches probiotiques commerciales du genre *Bacillus* ont été extraits et purifiés. Leur analyse par des techniques biochimique et spectroscopique a permis de déterminer leurs structures chimiques. L'étude de leurs activités immunologiques respectives a été réalisée sur différents modèles cellulaires, dans l'objectif d'établir une relation entre la structure et l'activité de ces molécules. Le rôle clé de la D-alanine dans la structure des LTAs a été démontré en hydrolysant spécifiquement les esters de D-alanine. Les LTA déalanylés perdent l'activité inflammatoire qu'ils induisent sur des macrophages, quelle que soit la souche donnée parmi les trois *Bacilli*. En revanche, nos résultats ne mettent pas en évidence de relation de proportionnalité entre le taux de substitution par la D-alanine et l'activité immunologique des LTAs. Les observations réalisées lors de cette étude, confortés par la littérature scientifique, révèlent le rôle clé de la structure des LTAs dans l'activité immunologique des probiotiques. Des études de relation structure-activité seront essentielles, elles représentent une suite parfaitement logique à notre travail préalable. Ce travail met en évidence l'extrême complexité de la surface des bactéries, de son caractère évolutif et par conséquent de l'immense difficulté à établir un lien entre sa structure et la capacité d'interaction de la bactérie avec son hôte. Il vient de faire l'objet d'une publication intitulée "Characterization of lipoteichoic acid structures from three probiotic *Bacillus* strains : involvement of D-alanine in their biological activity" parue dans le journal *Antonie van Leeuwenhoek* en 2014. L'ensemble de ces travaux consacrés à des souches de *Bacillus* probiotique pourra être transposé à d'autres espèces et genres bactériens d'intérêt probiotiques.

Références bibliographiques

- Al-Sheraji S. H., Ismail A., Manap M. Y., Mustafa S., Yusof R. M. et Hassan F. A.** (2013). "Prebiotics as functional foods: a review." *Journal of functional foods*. **5**(4): 1542-1553.
- Altmeyer S., Kröger S., Vahjen W., Zentek J. et Scharek-Tedin L.** (2014). "Impact of a probiotic *Bacillus cereus* strain on the jejunal epithelial barrier and on the NKG2D expressing immune cells during the weaning phase of piglets." *Veterinary immunology and immunopathology* **161**(1): 57-65.
- Altonsy M. O., Andrews S. C. et Tuohy K. M.** (2010). "Differential induction of apoptosis in human colonic carcinoma cells (Caco-2) by *Atopobium*, and commensal, probiotic and enteropathogenic bacteria: mediation by the mitochondrial pathway." *International journal of food microbiology* **137**(2): 190-203.
- Andersson H., Asp N.-G., Bruce A., Roos S., Wadstrom T. et Wold A. E.** (2001). "Health effects of probiotics and prebiotics: a literature review on human studies." *Scandinavian journal of gastroenterology. Supplement*. **45**: 58-75.
- Andoh A., Tsujikawa T. et Fujiyama Y.** (2003). "Role of dietary fiber and short-chain fatty acids in the colon." *Current pharmaceutical design* **9**(4): 347-358.
- Araya M., Morelli L., Reid G., Sanders M.-E., Stanton C., Pineiro M. et Ben Embarek P.** (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. *Report of a Joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food*. London, Ontario, Canada.
- Armstrong J. J., Baddiley J., Buchanan J. G., Carss B. et Greenberg G. R.** (1958). "Isolation and structure of ribitol phosphate derivatives (teichoic acids) from bacterial cell walls." *Journal of the Chemical Society*: 4344-4354.
- Artis D.** (2008). "Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut." *Nature reviews. Immunology*. **8**(6): 411-420.
- Asong J., Wolfert M. A., Maiti K. K., Miller D. et Boons G.-J.** (2009). "Binding and cellular activation studies reveal that Toll-like receptor 2 can differentially recognize peptidoglycan from Gram-positive and Gram-negative bacteria." *Journal of biological chemistry* **284**(13): 8643-8653.
- Avdeeva L. V., Osadchaia A. I. et Kharkhota M. A.** (2011). "Influence of lactitol and lactulose on adhesion properties of *Bacillus subtilis* probiotic strains." *Mikrobiologichnyi zhurnal* **74**(5): 22-25.
- Bahrami B., Child M. W., Macfarlane S. et Macfarlane G. T.** (2011). "Adherence and cytokine induction in Caco-2 cells by bacterial populations from a three-stage continuous-culture model of the large intestine." *Applied and environmental microbiology* **77**(9): 2934-2942.
- Baik J. E., Jang K. S., Kang S. S., Yun C. H., Lee K., Kim B. G., Kum K. Y. et Han S. H.** (2011). "Calcium hydroxide inactivates lipoteichoic acid from *Enterococcus faecalis* through deacylation of the lipid moiety." *Journal of endotoxin research* **37**(2): 191-196.
- Bandeira A., Mota-Santos T., Itohara S., Degermann S., Heusser C., Tonegawa S. et Coutinho A.** (1990). "Localization of gamma/delta T cells to the intestinal epithelium is independent of normal microbial colonization." *The Journal of experimental medicine* **172**(1): 239-244.

- Baron M. J. et Kasper D. L.** (2005). "Anchors away: contribution of a glycolipid anchor to bacterial invasion of host cells." *The Journal of clinical investigation*. **115**(9): 2325-2327.
- Basu S., Paul D. K., Ganguly S., Chatterjee M. et Chandra P. K.** (2009). "Efficacy of high-dose *Lactobacillus rhamnosus* GG in controlling acute watery diarrhea in Indian children: a randomized controlled trial." *Journal of clinical gastroenterology* **43**(3): 208-213.
- Batley M., Redmond J. W. et Wicken A. J.** (1987). "Nuclear magnetic resonance spectra of lipoteichoic acid." *Biochimica et biophysica acta*. **901**(1): 127-137.
- Belobrajdic D. P., King R. A., Christophersen C. T. et Bird A. R.** (2012). "Dietary resistant starch dose-dependently reduces adiposity in obesity-prone and obesity-resistant male rats." *Nutrition & metabolism* **9**: 93.
- Bengmark S.** (2008). Synbiotics in human Medicine. *Therapeutic microbiology: probiotics and related strategies*. J. W. Versalovic, M. Washington, DC, USA, ASM Press 307-321.
- Bengmark S.** (2010). "Pre-, Pro-, Synbiotics and Human Health." *Food technology and biotechnology* **48**(4): 464-475.
- Bidlingmeyer B. A., Cohen S. A. et Tarvin T. L.** (1984). "Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization." *Journal of chromatography* **336**(1): 93-104.
- Blanc L., Castanier R., Mishra A. K., Ray A., Besra G. S., Sutcliffe I., Vercellone A. et Nigou J.** (2013). "Gram-positive bacterial lipoglycans based on a glycosylated diacylglycerol lipid anchor are microbe-associated molecular patterns recognized by TLR2." *PLoS One* **8**(11): e81593.
- Bourreille A., Cadiot G., Le Dreau G., Laharie D., Beaugerie L., Dupas J. L., Marteau P., Rampal P., Moyses D. et Saleh A.** (2013). "*Saccharomyces boulardii* does not prevent relapse of crohn's disease." *Clinical gastroenterology and hepatology* **11**(8): 982-987.
- Boveri M., Kinsner A., Berezowski V., Lenfant A.-M., Draing C., Cecchelli R., Dehouck M.-P., Hartung T., Prieto P. et Bal-Price A.** (2006). "Highly purified lipoteichoic acid from gram-positive bacteria induces *in vitro* blood-brain barrier disruption through glia activation: role of pro-inflammatory cytokines and nitric oxide." *Neuroscience* **137**(4): 1193-1209.
- Bozdogan B., Galopin S. et Leclercq R.** (2004). "Characterization of a new erm-related macrolide resistance gene present in probiotic strains of *Bacillus clausii*." *Applied and environmental microbiology* **70**(1): 280-284.
- Bringiotti R., Lerardi E., Lovero R., Losurdo G., Di Leo A. et Principi M.** (2014). "Intestinal microbiota: the explosive mixture at the origin of inflammatory bowel disease?" *World journal of gastrointestinal pathophysiology* **5**(4): 550.
- Burns P., Sánchez B., Vinderola G., Ruas-Madiedo P., Ruiz L., Margolles A., Reinheimer J. et Clara G.** (2010). "Inside the adaptation process of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* to bile." *International journal of food microbiology* **142**(1): 132-141.
- Butcher E. C., Williams M., Youngman K., Rott L. et Briskin M.** (1999). "Lymphocyte trafficking and regional immunity." *Advances in immunology* **72**: 209-253.
- Casula G. et Cutting S. M.** (2002). "*Bacillus* probiotics: spore germination in the gastrointestinal tract." *Applied and environmental microbiology* **68**(5): 2344-2352.
- Cavaglieri C. R., Nishiyama A., Fernandes L. C., Curi R., Miles E. A. et Calder P. C.** (2003). "Differential effects of short-chain fatty acids on proliferation and production

- of pro-and anti-inflammatory cytokines by cultured lymphocytes." *Life sciences* **73**(13): 1683-1690.
- Cenci G., Trotta F. et Caldini G.** (2006). "Tolerance to challenges miming gastrointestinal transit by spores and vegetative cells of *Bacillus clausii*." *Journal of applied microbiology* **101**(6): 1208-1215.
- Cerezuela R., Fumanal M., Tapia-Paniagua S. T., Meseguer J., Morínigo M. Á. et Esteban M. Á.** (2013). "Changes in intestinal morphology and microbiota caused by dietary administration of inulin and *Bacillus subtilis* in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) specimens." *Fish & shellfish immunology* **34**(5): 1063-1070.
- Chai Y., Beaugerard P. B., Vlamakis H., Losick R. et Kolter R.** (2012). "Galactose metabolism plays a crucial role in biofilm formation by *Bacillus subtilis*." *MBio* **3**(4): e00184-00112.
- Chan K. G., Mayer M., Davis E. M., Halperin S. A., Lin T.-J. et Lee S. F.** (2007). "Role of D-alanylation of *Streptococcus gordonii* lipoteichoic acid in innate and adaptive immunity." *Infection and immunity* **75**(6): 3033-3042.
- Chapat L., Chemin K., Dubois B., Bourdet-Sicard R. et Kaiserlian D.** (2004). "*Lactobacillus casei* reduces CD8+ T cell-mediated skin inflammation." *European journal of immunology* **34**(9): 2520-2528.
- Chen Jr P. S., Toribara T. Y. et Warner H.** (1956). "Microdetermination of phosphorus." *Analytical chemistry* **28**(11): 1756-1758.
- Chermesh I. et Shamir R.** (2009). "Rôle du microbiote dans les maladies inflammatoires de l'intestin." *Annales Nestlé (Ed. française)* **67**(1): 27-38.
- Chhatwal G. S.** (2002). "Anchorless adhesins and invasins of Gram-positive bacteria: a new class of virulence factors." *Trends in microbiology* **10**(5): 205-208.
- Chiang B. L., Sheih Y. H., Wang L. H., Liao C. K. et Gill H. S.** (2000). "Enhancing immunity by dietary consumption of a probiotic lactic acid bacterium (*Bifidobacterium lactis* HN019): optimization and definition of cellular immune responses." *European journal of clinical nutrition* **54**(11): 849-855.
- Ciffo F.** (1984). "Determination of the spectrum of antibiotic resistance of the "*Bacillus subtilis*" strains of Enterogermina." *Chemioterapia: international journal of the Mediterranean Society of Chemotherapy* **3**(1): 45-52.
- Ciffo F., Dacarro C., Giovanetti M. et Mazza P. G.** (1987). "Gastric resistance of *Bacillus subtilis* spores used in oral bacteriotherapy: *in vitro* studies." *Farmacia terapia* **4**: 163-169.
- Ciprandi G., Tosca M. A., Milanese M., Caligo G. et Ricca V.** (2004). "Cytokines evaluation in nasal lavage of allergic children after *Bacillus clausii* administration: a pilot study." *Pediatric allergy and immunology* **15**(2): 148-151.
- Ciprandi G., Vizzaccaro A., Cirillo I. et Tosca M. A.** (2005). "*Bacillus clausii* exerts immuno-modulatory activity in allergic subjects: a pilot study." *European annals of allergy and clinical immunology* **37**(4): 129-134.
- Claeson M. et Merson M. H.** (1990). "Global progress in the control of diarrheal diseases." *The Pediatric infectious disease journal* **9**(5): 345-355.
- Clarke J. O. et Mullin G. E.** (2008). "A review of complementary and alternative approaches to immunomodulation." *Nutrition in clinical practice* **23**(1): 49-62.
- Colarelli M.** (2010). Les probiotiques, du conseil officinal à la prise en charge micronutritionnelle. *Faculté de Pharmacie*. Nancy, Université Henry Poincaré - Nancy 1. **PhD**.
- Coombes J. L. et Maloy K. J.** (2007). *Control of intestinal homeostasis by regulatory T cells and dendritic cells*. Seminars in immunology, Elsevier.

- Corfield A. P.** (2014). "Mucins: A biologically relevant glycan barrier in mucosal protection." *Biochimica et biophysica acta*.
- Corr S. C., Hill C. et Gahan C. G. M.** (2009). "Understanding the mechanisms by which probiotics inhibit gastrointestinal pathogens." *Advances in food and nutrition research* **56**: 1-15.
- Cot M., Ray A., Gilleron M., Vercellone A., Larrouy-Maumus G., Armau E., Gauthier S., Tiraby G., Puzo G. et Nigou J. m.** (2011). "Lipoteichoic acid in *Streptomyces hygroscopicus*: structural model and immunomodulatory activities." *PLoS One* **6**(10): e26316.
- Crabbe P. A., Bazin H., Eyssen H. et Heremans J. F.** (1968). "The normal microbial flora as a major stimulus for proliferation of plasma cells synthesizing IgA in the gut." *International archives of allergy and immunology*. **34**(4): 362-375.
- Cross M. L. et Gill H.** (2001). "Can immunoregulatory lactic acid bacteria be used as dietary supplements to limit allergies?" *International archives of allergy and immunology*. **125**(2): 112-119.
- Cummings J. H. et Macfarlane G. T.** (2002). "Gastrointestinal effects of prebiotics." *The British journal of nutrition* **87**(S2): S145-S151.
- Cutting S. M.** (2011). "Bacillus probiotics." *Food Microbiology* **28**(2): 214-220.
- Cutting S. M.** (2014). *What makes a Bacillus probiotic effective in livestock production?* Chr. Hansen Seminar, London.
- Dammermann W., Wollenberg L., Bentzien F., Lohse A. et Luth S.** (2013). "Toll like receptor 2 agonists lipoteichoic acid and peptidoglycan are able to enhance antigen specific IFN γ release in whole blood during recall antigen responses." *Journal of immunological methods*. **396**(1-2): 107-115.
- Davie J. R.** (2003). "Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate." *The Journal of nutrition* **133**(7): 2485S-2493S.
- Davie J. R.** (2003). "Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate." *The Journal of nutrition* **133**(7 Suppl): 2485S-2493S.
- De Smet K. et Contreras R.** (2005). "Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins." *Biotechnology letters* **27**(18): 1337-1347.
- de Vrese M. et Schrezenmeir J.** (2008). "Probiotics, prebiotics, and synbiotics." *Advances in biochemical engineering/biotechnology* **111**: 1-66.
- Debard N., Siervo F. et Kraehenbuhl J.-P.** (1999). *Development of Peyer's patches, follicle-associated epithelium and M cell: lessons from immunodeficient and knockout mice*. Seminars in immunology, Elsevier.
- Deininger S., Figueroa-Perez I., Sigel S., Stadelmaier A., Schmidt R. R., Hartung T. et von Aulock S.** (2007). "Use of synthetic derivatives to determine the minimal active structure of cytokine-inducing lipoteichoic acid." *Clinical and vaccine immunology* **14**(12): 1629-1633.
- Deininger S., Stadelmaier A., von Aulock S., Morath S., Schmidt R. R. et Hartung T.** (2003). "Definition of structural prerequisites for lipoteichoic acid-inducible cytokine induction by synthetic derivatives." *The journal of immunology* **170**(8): 4134-4138.
- Deininger S., Traub S., Aichele D., Rupp T., Baris T., Möller H. M., Hartung T. et von Aulock S.** (2008). "Presentation of lipoteichoic acid potentiates its inflammatory activity." *Immunobiology* **213**(6): 519-529.
- Delcenserie V., Martel D., Lamoureux M., Amiot J., Boutin Y. et Roy D.** (2008). "Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract." *Current issues in molecular biology* **10**(1/2): 37.

- Delcour J., Ferain T., Deghorain M., Palumbo E. et Hols P.** (1999). The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*, Springer: 159-184.
- Delzenne N. M.** (2003). "Oligosaccharides: state of the art." *Proceedings of the Nutrition Society* **62**(01): 177-182.
- Delzenne N. M., Daubioul C., Neyrinck A., Lasa M. et Taper H. S.** (2002). "Inulin and oligofructose modulate lipid metabolism in animals: review of biochemical events and future prospects." *British journal of nutrition* **87 Suppl 2**: S255-259.
- Deng J., Li Y., Zhang J. et Yang Q.** (2013). "Co-administration of *Bacillus subtilis* RJGP16 and *Lactobacillus salivarius* B1 strongly enhances the intestinal mucosal immunity of piglets." *Research in veterinary science* **94**(1): 62-68.
- Deplancke B. et Gaskins R. H.** (2001). "Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer." *The American journal of clinical nutrition* **73**(6): 1131S-1141S.
- DiGiulio D. B., Romero R., Amogan H. P., Kusanovic J. P., Bik E. M., Gotsch F., Kim C. J., Erez O., Edwin S. et Relman D. A.** (2008). "Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation." *PLoS One* **3**(8): e3056.
- Doan T. et Aymerich S.** (2003). "Regulation of the central glycolytic genes in *Bacillus subtilis*: binding of the repressor CggR to its single DNA target sequence is modulated by fructose-1, 6-bisphosphate." *Molecular microbiology* **47**(6): 1709-1721.
- Dominguez-Bello M. G., Costello E. K., Contreras M., Magris M., Hidalgo G., Fierer N. et Knight R.** (2010). "Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**(26): 11971-11975.
- Donohoe D. R., Garge N., Zhang X., Sun W., O'Connell T. M., Bunger M. K. et Bultman S. J.** (2011). "The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon." *Cell metabolism* **13**(5): 517-526.
- Drisko J. A., Giles C. K. et Bischoff B. J.** (2003). "Probiotics in health maintenance and disease prevention." *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutics*. **8**(2): 143-155.
- Dubois M., Gilles K., Hamilton J. K., Rebers P. A. et Smith F.** (1951). "A colorimetric method for the determination of sugars." *Nature*: 167.
- Duc L. H., Hong H. A., Barbosa T. M., Henriques A. O. et Cutting S. M.** (2004). "Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use." *Applied and environmental microbiology* **70**(4): 2161-2171.
- Duc L. H., Hong H. A. et Cutting S. M.** (2003). "Germination of the spore in the gastrointestinal tract provides a novel route for heterologous antigen delivery." *Vaccine* **21**(27): 4215-4224.
- EFSA** (2012). Scientific Opinion on Toyocerin® (*Bacillus cereus*) as a feed additive for sows, piglets, pigs for fattening, cattle for fattening, calves for rearing, chickens for fattening and rabbits for fattening, EFSA. **10**: 2924.
- Fabre E.** (2004). Caractérisation de la dextrane-saccharase DSR-E de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 et application à la synthèse de composés prébiotiques. INSA. Toulouse, Université de Toulouse. **PhD**.
- Fanaro S., Chierici R., Guerrini P. et Vigi V.** (2003). "Intestinal microflora in early infancy: composition and development." *Acta paediatrica* **92**(s441): 48-55.

- Fang H., Elina T., Heikki A. et Seppo S.** (2000). "Modulation of humoral immune response through probiotic intake." *FEMS immunology and medical microbiology* **29**(1): 47-52.
- Fanning S., Hall L. J., Cronin M., Zomer A., MacSharry J., Goulding D., Motherway M. O. C., Shanahan F., Nally K. et Dougan G.** (2012). "Bifidobacterial surface-exopolysaccharide facilitates commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**(6): 2108-2113.
- FAO/WHO** (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in foods, Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report.
- Fischer H., Yamamoto M., Akira S., Beutler B. et Svanborg C.** (2006). "Mechanism of pathogen-specific TLR4 activation in the mucosa: Fimbriae, recognition receptors and adaptor protein selection." *European journal of immunology* **36**(2): 267-277.
- Fischer K., Stein K., Ulmer A. J., Lindner B., Heine H. et Holst O.** (2011). "Cytokine-inducing lipoteichoic acids of the allergy-protective bacterium *Lactococcus lactis* G121 do not activate via Toll-like receptor 2." *Glycobiology* **21**(12): 1588-1595.
- Fischer W.** (1987). "Lipoteichoic acid of *Bifidobacterium bifidum* subspecies *pennsylvanicum* DSM 20239." *European journal of biochemistry* **165**(3): 639-646.
- Fischer W.** (1988). "Physiology of lipoteichoic acids in bacteria." *Advances in microbial physiology* **29**: 233-302.
- Fischer W.** (1997). "Lipoteichoic acid and teichoic acid biosynthesis. Targets of new antibiotics." *Biospektrum* **1997**: 47-50.
- Fittipaldi N., Sekizaki T., Takamatsu D., Harel J., de la Cruz Domínguez-Punaro M., Von Aulock S., Draing C., Marois C., Kobisch M. et Gottschalk M.** (2008). "D-alanylation of lipoteichoic acid contributes to the virulence of *Streptococcus suis*." *Infection and immunity* **76**(8): 3587-3594.
- Ford A. C., Quigley E. M. M., Lacy B. E., Lembo A. J., Saito Y. A., Schiller L. R., Soffer E. E., Spiegel B. M. R. et Moayyedi P.** (2014). "Efficacy of prebiotics, probiotics, and synbiotics in irritable bowel syndrome and chronic idiopathic constipation: Systematic review and meta-analysis." *The American journal of gastroenterology* **109**(10): 1547-1561.
- Frank D. N., Amand A. L., Feldman R. A., Boedeker E. C., Harpaz N. et Pace N. R.** (2007). "Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**(34): 13780-13785.
- Galdeano M. C. et Perdigon G.** (2006). "The probiotic bacterium *Lactobacillus casei* induces activation of the gut mucosal immune system through innate immunity." *Clinical and vaccine immunology* **13**(2): 219-226.
- Gao J. J., Xue Q., Zuvanich E. G., Hagi K. R. et Morrison D. C.** (2001). "Commercial preparations of lipoteichoic acid contain endotoxin that contributes to activation of mouse macrophages in vitro." *Infection and immunity* **69**(2): 751-757.
- Garimella R., Halye J. L., Harrison W., Klebba P. E. et Rice C. V.** (2009). "Conformation of the phosphate D-alanine zwitterion in bacterial teichoic acid from nuclear magnetic resonance spectroscopy." *Biochemistry* **48**(39): 9242-9249.
- Geng X., Dong X.-H., Tan B.-P., Yang Q.-H., Chi S.-Y., Liu H.-Y. et Liu X.-Q.** (2011). "Effects of dietary chitosan and *Bacillus subtilis* on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum*." *Fish & shellfish immunology* **31**(3): 400-406.

- Giamarellos-Bourboulis E. J., Bengmark S., Kanellakopoulou K. et Kotzampassi K.** (2009). "Pro-and synbiotics to control inflammation and infection in patients with multiple injuries." *The journal of trauma and acute care surgery*. **67**(4): 815-821.
- Gibson G. R. et Roberfroid M. B.** (1995). "Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics." *The Journal of nutrition* **125**(6): 1401-1412.
- Gibson G. R., Willems A., Reading S. et Collins M. D.** (1996). "Fermentation of non-digestible oligosaccharides by human colonic bacteria." *Proceedings of the nutrition Society* **55**(3): 899-912.
- Ginsburg I.** (2002). "Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation." *The Lancet infectious diseases* **2**(3): 171-179.
- Gisch N., Kohler T., Ulmer A. J., Müthing J., Pribyl T., Fischer K., Lindner B., Hammerschmidt S. et Zähringer U.** (2013). "Structural reevaluation of *Streptococcus pneumoniae* lipoteichoic acid and new insights into its immunostimulatory potency." *Journal of biological chemistry* **288**(22): 15654-15667.
- Granato D., Perotti F., Masserey I., Rouvet M., Golliard M., Servin A. et Brassart D.** (1999). "Cell surface-associated lipoteichoic acid acts as an adhesion factor for attachment of *Lactobacillus johnsonii* La1 to human enterocyte-like Caco-2 cells." *Applied and environmental microbiology* **65**(3): 1071-1077.
- Grandy G., Medina M., Soria R., Terán C. G. et Araya M.** (2010). "Probiotics in the treatment of acute *Rotavirus* diarrhoea. A randomized, double-blind, controlled trial using two different probiotic preparations in Bolivian children." *BMC infectious diseases* **10**(1): 253.
- Grangette C.** (2007). "Probiotiques et régulation de la réponse immune allergique et inflammatoire." *Cahiers de Nutrition et de Diététique* **42**: 76-85.
- Grangette C., Nutten S., Palumbo E., Morath S., Hermann C., Dewulf J., Pot B., Hartung T., Hols P. et Mercenier A.** (2005). "Enhanced antiinflammatory capacity of a *Lactobacillus plantarum* mutant synthesizing modified teichoic acids." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(29): 10321-10326.
- Green L. C., Wagner D. A., Glogowski J., Skipper P. L., Wishnok J. S. et Tannenbaum S. R.** (1982). "Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids." *Analytical biochemistry* **126**(1): 131-138.
- Greenberg J. W., Fischer W. et Joiner K. A.** (1996). "Influence of lipoteichoic acid structure on recognition by the macrophage scavenger receptor." *Infection and immunity* **64**(8): 3318-3325.
- Griess P.** (1879). "Griess reagent: A solution of sulphanilic acid and α -naphthylamine in acetic acid which gives a pink colour on reaction with the solution obtained after decomposition of nitrosyl complexes." *Chemische Berichte* **12**: 427.
- Ha E.-M.** (2011). "The impact of gut microbiota in human health and diseases: implications for therapeutic potential " *Biomolecules & therapeutics* **19**(2): 155-173.
- Hamada H., Hiroi T., Nishiyama Y., Takahashi H., Masunaga Y., Hachimura S., Kaminogawa S., Takahashi-Iwanaga H., Iwanaga T. et Kiyono H.** (2002). "Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine." *The journal of immunology* **168**(1): 57-64.
- Hamon E.** (2011). Utilisation de l'analyse protéomique dans la caractérisation des bactéries d'intérêt probiotique. *Sciences analytiques*. Strasbourg, Université de Strasbourg.

- Hamon E., Horvatovich P., Bisch M., Bringel F., Marchioni E., Aoudé-Werner D. et Ennahar S. (2011a). "Investigation of biomarkers of bile tolerance in *Lactobacillus casei* using comparative proteomics." *Journal of proteome research* **11**(1): 109-118.
- Hamon E., Horvatovich P., Izquierdo E., Bringel F., Marchioni E., Aoudé-Werner D. et Ennahar S. (2011b). "Comparative proteomic analysis of *Lactobacillus plantarum* for the identification of key proteins in bile tolerance." *BMC microbiology* **63**(1): 11.
- Han S. H., Kim J. H., Martin M., Michalek S. M. et Nahm M. H. (2003). "Pneumococcal lipoteichoic acid (LTA) is not as potent as staphylococcal LTA in stimulating Toll-like receptor 2." *Infection and immunity* **71**(10): 5541-5548.
- Hanski I., von Hertzen L., Fyhrquist N., Koskinen K., Torppa K., Laatikainen T., Karisola P., Auvinen P., Paulin L. et Mäkelä M. J. (2012). "Environmental biodiversity, human microbiota, and allergy are interrelated." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**(21): 8334-8339.
- Hart A. L., Lammers K., Brigidi P., Vitali B., Rizzello F., Gionchetti P., Campieri M., Kamm M. A., Knight S. C. et Stagg A. J. (2004). "Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria." *Gut* **53**(11): 1602-1609.
- Hayashi F., Smith K. D., Ozinsky A., Hawn T. R., Yi E. C., Goodlett D. R., Eng J. K., Akira S., Underhill D. M. et Aderem A. (2001). "The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5." *Nature* **410**(6832): 1099-1103.
- He F., Ouwehand A. C., Isolauri E., Hashimoto H., Benno Y. et Salminen S. (2001). "Comparison of mucosal adhesion and species identification of bifidobacteria isolated from healthy and allergic infants." *FEMS immunology and medical microbiology*. **30**(1): 43-47.
- Hemarajata P. et Versalovic J. (2012). "Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation." *Therapeutic advances in gastroenterology*: 1756283X12459294.
- Heyman M. et Heuvelin E. (2006). Probiotic micro-organisms and immune regulation: the paradox. *Métabolisme Nce (ed) VIe Symposium nutrition « Intervention nutritionnelle : de la prévention à la thérapeutique »*. N. C. e. Métabolisme. Brest, France, Nutrition Clinique et Métabolisme. **20**: 85-94.
- Hill C., Guarner F., Reid G., Gibson G. R., Merenstein D. J., Pot B., Morelli L., Canani R. B., Flint H. J. et Salminen S. (2014). "Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic." *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*.
- Hoentjen F., Welling G. W., Harmsen H. J., Zhang X., Snart J., Tannock G. W., Lien K., Churchill T. A., Lupicki M. et Dieleman L. A. (2005). "Reduction of colitis by prebiotics in HLA-B27 transgenic rats is associated with microflora changes and immunomodulation." *Inflammatory bowel diseases* **11**(11): 977-985.
- Hofmann A. F. et Hagey L. R. (2008). "Bile acids: chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics." *Cellular and molecular life sciences* **65**(16): 2461-2483.
- Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P. H. A., Staley J. T. et Williams S. T. (1994). "Bergey's manual of determinative bacteriology." *Baltimore: Williams and Wilkins* **787**.
- Holzappel W. H. et Schillinger U. (2002). "Introduction to pre-and probiotics." *Food research international*. **35**(2): 109-116.
- Hong S. W., Baik J. E., Kang S. S., Yun C. H., Seo D. G. et Han S. H. (2014). "Lipoteichoic acid of *Streptococcus mutans* interacts with Toll-like receptor 2 through

- the lipid moiety for induction of inflammatory mediators in murine macrophages." *Molecular immunology* **57**(2): 284-291.
- Hooper L. V.** (2004). "Bacterial contributions to mammalian gut development." *Trends in microbiology* **12**(3): 129-134.
- Hooper L. V., Littman D. R. et Macpherson A. J.** (2012). "Interactions between the microbiota and the immune system." *Science* **336**(6086): 1268-1273.
- Hosono A., Ozawa A., Kato R., Ohnishi Y., Nakanishi Y., Kimura T. et Nakamura R.** (2003). "Dietary fructooligosaccharides induce immunoregulation of intestinal IgA secretion by murine Peyer's patch cells." *Biosciences biotechnology and biochemistry* **67**(4): 758-764.
- Hsiao G., Huang H.-Y., Fong T.-H., Shen M.-Y., Lin C.-H., Teng C.-M. et Sheu J.-R.** (2004). "Inhibitory mechanisms of YC-1 and PMC in the induction of iNOS expression by lipoteichoic acid in RAW 264.7 macrophages." *Biochemical pharmacology* **67**(7): 1411-1419.
- Inan M. S., Rasoulpour R. J., Yin L., Hubbard A. K., Rosenberg D. W. et Giardina C.** (2000). "The luminal short-chain fatty acid butyrate modulates NF-kappaB activity in a human colonic epithelial cell line." *Gastroenterology* **118**(4): 724-734.
- Ishizaka S., Kikuchi E. et Tsujii T.** (1993). "Effects of acetate on human immune system." *Immunopharmacology and immunotoxicology* **15**(2-3): 151-162.
- Isolauri E., Salminen S. et Ouwehand A. C.** (2004). "Probiotics." *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* **18**(2): 299-313.
- Iwasaki H., Shimada A., Yokoyama K. et Ito E.** (1989). "Structure and glycosylation of lipoteichoic acids in *Bacillus* strains." *Journal of bacteriology* **171**(1): 424-429.
- Jan G., Belzacq A. S., Haouzi D., Rouault A., Metivier D., Kroemer G. et Brenner C.** (2002). "Propionibacteria induce apoptosis of colorectal carcinoma cells via short-chain fatty acids acting on mitochondria." *Cell death and differentiation* **9**(2): 179-188.
- Jang K.-S., Baik J. E., Han S. H., Chung D. K. et Kim B.-G.** (2011). "Multi-spectrometric analyses of lipoteichoic acids isolated from *Lactobacillus plantarum*." *Biochemical and biophysical research communications* **407**(4): 823-830.
- Jankowska A., Laubitz D., Antushevich H., Zabielski R. et Grzesiuk E.** (2008). "Competition of *Lactobacillus paracasei* with *Salmonella enterica* for adhesion to Caco-2 cells." *BioMed research international* **2008**.
- Jeurink P. V., van Esch B. C., Rijniere A., Garssen J. et Knippels L. M. J.** (2013). "Mechanisms underlying immune effects of dietary oligosaccharides." *The American journal of clinical nutrition* **98**(2): 572S-577S.
- Jiménez E., Marín M. L., Martín R., Odriozola J. M., Olivares M., Xaus J., Fernández L. et Rodríguez J. M.** (2008). "Is meconium from healthy newborns actually sterile?" *Research in microbiology* **159**(3): 187-193.
- Jin M. S., Kim S. E., Heo J. Y., Lee M. E., Kim H. M., Paik S.-G., Lee H. et Lee J.-O.** (2007). "Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide." *Cell* **130**(6): 1071-1082.
- Johnston B. C., Supina A. L., Ospina M. et Vohra S.** (2007). "Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea." *The Cochrane database of systematic reviews* **2**.
- Jones K.** (2010). "Probiotics: Preventing Antibiotic-Associated Diarrhea." *Journal for specialists in pediatric nursing* **15**(2): 160-162.

- Kaila M., Isolauri E., Soppi E., Virtanen E., Laine S. et Arvilommi H.** (1992). "Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain." *Pediatric research* **32**(2): 141-144.
- Kalliomäki M.** (2009). "Le rôle du microbiote dans l'allergie." *Annales Nestlé* **67**(1): 19-26.
- Kamar R., Gohar M., Jéhanno I., Réjasse A., Kallassy M., Lereclus D., Sanchis V. et Ramarao N.** (2013). "Pathogenic potential of *Bacillus cereus* strains as revealed by phenotypic analysis." *Journal of clinical microbiology* **51**(1): 320-323.
- Kaneko T., Yokoyama A. et Suzuki M.** (1995). "Digestibility characteristics of isomaltooligosaccharides in comparison with several saccharides using the rat jejunum loop method." *Biosciences biotechnology and biochemistry* **59**(7): 1190-1194.
- Kang J. Y., Nan X., Jin M. S., Youn S.-J., Ryu Y. H., Mah S., Han S. H., Lee H., Paik S.-G. et Lee J.-O.** (2009). "Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 heterodimer." *Immunity* **31**(6): 873-884.
- Kang S.-S., Ryu Y. H., Baik J. E., Yun C.-H., Lee K., Chung D. K. et Han S. H.** (2011). "Lipoteichoic acid from *Lactobacillus plantarum* induces nitric oxide production in the presence of interferon- γ in murine macrophages." *Molecular immunology* **48**(15): 2170-2177.
- Kelly D., Conway S. et Aminov R.** (2005). "Commensal gut bacteria: mechanisms of immune modulation." *Trends in immunology* **26**(6): 326-333.
- Kerneis S., Bogdanova A., Kraehenbuhl J.-P. et Pringault E.** (1997). "Conversion by Peyer's patch lymphocytes of human enterocytes into M cells that transport bacteria." *Science* **277**(5328): 949-952.
- Ketabi A., Dieleman L. A. et Gänzle M. G.** (2011). "Influence of isomaltooligosaccharides on intestinal microbiota in rats." *Journal of applied microbiology* **110**(5): 1297-1306.
- Kharkhota M. A., Osadchaia A. I. et Avdeeva L. V.** (2011). "Prebiotic properties of lactite and lactulose under creation of synbiotics of bacillus genus bacteria." *Mikrobiolohichnyi zhurnal* **74**(1): 52-58.
- Kim H. G., Gim M. G., Kim J. Y., Jin Hwang H., Ham M. S., Lee J. M., Hartung T., Park J. W., Han S. H. et 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 immunology and medical microbiology* **49**(2): 205-214.
- Kim H. G., Lee S. Y., Kim N.-R., Ko M. Y., Lee J. M., Yi T.-H., Chung S. K. et Chung D. K.** (2008). "Inhibitory effects of *Lactobacillus plantarum* lipoteichoic acid (LTA) on *Staphylococcus aureus* LTA-induced tumor necrosis factor-alpha production." *Journal of microbiology and biotechnology* **18**(6): 1191-1196.
- Kimbrell M. R., Warshakoon H., Cromer J. R., Malladi S., Hood J. D., Balakrishna R., Scholdberg T. A. et David S. A.** (2008). "Comparison of the immunostimulatory and proinflammatory activities of candidate Gram-positive endotoxins, lipoteichoic acid, peptidoglycan, and lipopeptides, in murine and human cells." *Immunology letters* **118**(2): 132-141.
- Kirjavainen P. V., Arvola T., Salminen S. J. et Isolauri E.** (2002). "Aberrant composition of gut microbiota of allergic infants: a target of bifidobacterial therapy at weaning?" *Gut* **51**(1): 51-55.
- Knight D. J., Gardiner D., Banks A., Snape S. E., Weston V. C., Bengmark S. et Girling K. J.** (2009). "Effect of synbiotic therapy on the incidence of ventilator associated pneumonia in critically ill patients: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial." *Intensive care medicine* **35**(5): 854-861.

- Ko T., Keisuke T., Kaneko T., Shiota M., Fukui F., Takaku H., Nakagawa Y., Ichikawa T. et Kobayashi S.** (1992). "Metabolism of ^{13}C -isomaltooligosaccharides in healthy men." *Biosciences biotechnology and biochemistry* **56**(6): 937-940.
- Kosaka T., Maeda T., Nakada Y., Yukawa M. et Tanaka S.** (1998). "Effect of *Bacillus subtilis* spore administration on activation of macrophages and natural killer cells in mice." *Veterinary microbiology* **60**(2): 215-225.
- Kostic A. D., Howitt M. R. et Garrett W. S.** (2013). "Exploring host-microbiota interactions in animal models and humans." *Genes & development*. **27**(7): 701-718.
- Kotowska M., Albrecht P. et Szajewska H.** (2005). "*Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in children: a randomized double-blind placebo-controlled trial." *Alimentary pharmacology & therapeutics*. **21**(5): 583-590.
- Kotzampassi K., Giamarellos-Bourboulis E. J., Voudouris A., Kazamias P. et Eleftheriadis E.** (2006). "Benefits of a synbiotic formula (Synbiotic 2000Forte) in critically ill trauma patients: early results of a randomized controlled trial." *World journal of surgery* **30**(10): 1848-1855.
- Kruis W., Frič P., Pokrotnieks J., Lukáš M., Fixa B., Kaščák M., Kamm M. A., Weismueller J., Beglinger C. et Stolte M.** (2004). "Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine." *Gut* **53**(11): 1617-1623.
- Kumar M., Kumar A., Nagpal R., Mohania D., Behare P., Verma V., Kumar P., Poddar D., Aggarwal P. K. et Henry C.** (2010). "Cancer-preventing attributes of probiotics: an update." *International journal of food sciences and nutrition* **61**(5): 473-496.
- Kumar M., Verma V., Nagpal R., Kumar A., Behare P. V., Singh B. et Aggarwal P. K.** (2012). "Anticarcinogenic effect of probiotic fermented milk and chlorophyllin on aflatoxin-B1-induced liver carcinogenesis in rats." *British journal of nutrition* **107**(07): 1006-1016.
- Kurdi P., Kawanishi K., Mizutani K. et Yokota A.** (2006). "Mechanism of growth inhibition by free bile acids in lactobacilli and bifidobacteria." *Journal of bacteriology* **188**(5): 1979-1986.
- Laemmli U. K.** (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-685.
- Lammers K. M., Helwig U., Swennen E., Rizzello F., Venturi A., Caramelli E., Kamm M. A., Brigidi P., Gionchetti P. et Campieri M.** (2002). "Effect of probiotic strains on interleukin 8 production by HT29/19A cells." *The American journal of gastroenterology* **97**(5): 1182-1186.
- Laparra J. M. et Sanz Y.** (2010). "Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals." *Pharmacological research* **61**(3): 219-225.
- Leatham M. P., Banerjee S., Autieri S. M., Mercado-Lubo R., Conway T. et Cohen P. S.** (2009). "Precolonized human commensal *Escherichia coli* strains serve as a barrier to *E. coli* O157: H7 growth in the streptomycin-treated mouse intestine." *Infection and immunity* **77**(7): 2876-2886.
- Lebeer S., Vanderleyden J. et De Keersmaecker S. C. J.** (2010). "Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens." *Nature reviews. Microbiology*. **8**(3): 171-184.
- LeBlanc J. G., Milani C., de Giori G. S., Sesma F., van Sinderen D. et Ventura M.** (2013). "Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective." *Current opinion in biotechnology* **24**(2): 160-168.
- Lee Y. K. et Salminen S.** (2009). *Handbook of probiotics and prebiotics*, John Wiley & Sons.

- Leopold K. et Fischer W.** (1992). "Heterogeneity of lipoteichoic acid detected by anion exchange chromatography." *Archives of microbiology* **157**(5): 446-450.
- Lepage G. et Roy C. C.** (1986). "Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction." *Journal of lipid research* **27**(1): 114-120.
- Leser T. D., Knarreborg A. et Worm J.** (2008). "Germination and outgrowth of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* spores in the gastrointestinal tract of pigs." *Journal of applied microbiology* **104**(4): 1025-1033.
- Li J., Tan B. et Mai K.** (2009). "Dietary probiotic *Bacillus* OJ and isomaltooligosaccharides influence the intestine microbial populations, immune responses and resistance to white spot syndrome virus in shrimp (*Litopenaeus vannamei*)." *Aquaculture* **291**(1): 35-40.
- Li S. R., Wang H. H., Wu Z. Y., Liu R. H., Tong M. H., Wang C. H., Wang R. L., Zhao H. C. et Wei W.** (2012). "Efficacies of lactulose plus live combined *Bacillus subtilis* and *Enterococcus faecium* capsules in the treatment of functional constipation: a multicenter, randomized, double blind, controlled trial." *Zhonghua yi xue za zhi* **92**(42): 2955-2960.
- Li X., Ding X., Xia L., Sun Y., C. Y. et Yin J.** (2012). "Proteomic analysis of *Bacillus thuringiensis* strain 4.0718 at different growth phases." *The scientific world journal* **2012**(798739).
- Li Y., Wu S., Wang L., Li Y., Shi F. et Wang X.** (2010). "Differentiation of bacteria using fatty acid profiles from gas chromatography–tandem mass spectrometry." *Journal of the Science of Food and Agriculture* **90**(8): 1380-1383.
- Likotrafiti E., Tuohy K. M., Gibson G. R. et Rastall R. A.** (2014). "An *in vitro* study of the effect of probiotics, prebiotics and synbiotics on the elderly faecal microbiota." *Anaerobe* **27**: 50-55.
- Livingston M., Loach D., Wilson M., Tannock G. W. et Baird M.** (2010). "Gut commensal *Lactobacillus reuteri* 100-23 stimulates an immunoregulatory response." *Immunology and cell biology* **88**(1): 99-102.
- Lozupone C. A., Stombaugh J. I., Gordon J. I., Jansson J. K. et Knight R.** (2012). "Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota." *Nature* **489**(7415): 220-230.
- Lu R., Fasano S., Madayiputhiya N., Morin N. P., Nataro J. et Fasano A.** (2009). "Isolation, identification, and characterization of small bioactive peptides from *Lactobacillus* GG conditional media that exert both anti-Gram-negative and Gram-positive bactericidal activity." *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **49**(1): 23-30.
- Macfarlane G. T. et Macfarlane S.** (1997). "Human colonic microbiota: ecology, physiology and metabolic potential of intestinal bacteria." *Scandinavian journal of gastroenterology. Supplement.* **32**(222): 3-9.
- Macfarlane G. T., Steed H. et Macfarlane S.** (2008). "Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics." *Journal of applied microbiology* **104**(2): 305-344.
- Macfarlane S., Macfarlane G. T. et Cummings J. H.** (2006). "Review article: prebiotics in the gastrointestinal tract." *Alimentary pharmacology & therapeutics.* **24**(5): 701-714.
- Mackowiak P. A.** (2013). "Recycling Metchnikoff: probiotics, the intestinal microbiome and the quest for long life." *Frontiers in public health.* **1**.
- Macpherson A. J. et Uhr T.** (2004). "Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria." *Science* **303**(5664): 1662-1665.

- Madsen K.** (2006). "Probiotics and the immune response." *Journal of clinical gastroenterology* **40**(3): 232-234.
- Maidens C., Childs C., Przemska A., Dayel I. B. et Yaqoob P.** (2013). "Modulation of vaccine response by concomitant probiotic administration." *British journal of clinical pharmacology* **75**(3): 663-670.
- Marletta M. A.** (1988). "Mammalian synthesis of nitrite, nitrate, nitric oxide, and N-nitrosating agents." *Chemical research in toxicology* **1**(5): 249-257.
- Marseglia G. L., Tosca M., Cirillo I., Licari A., Leone M., Marseglia A., Castellazzi A. M. et Ciprandi G.** (2007). "Efficacy of *Bacillus clausii* spores in the prevention of recurrent respiratory infections in children: a pilot study." *Therapeutics and clinical risk management* **3**(1): 13-17.
- Matsuguchi T., Takagi A., Matsuzaki T., Nagaoka M., Ishikawa K., Yokokura T. et Yoshikai Y.** (2003). "Lipoteichoic acids from *Lactobacillus* strains elicit strong tumor necrosis factor alpha-inducing activities in macrophages through Toll-like receptor 2." *Clinical and diagnostic laboratory immunology* **10**(2): 259-266.
- Matthes H., Krummenerl T., Giensch M., Wolff C. et Schulze J.** (2010). "Clinical trial: probiotic treatment of acute distal ulcerative colitis with rectally administered *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN)." *BMC complementary and Alternative medicine* **10**(1): 13.
- Mazza P.** (1994). "The use of *Bacillus subtilis* as an antidiarrhoeal microorganism." *Bollettino chimico farmaceutico* **133**(1): 3-18.
- McDermott A. J. et Huffnagle G. B.** (2014). "The microbiome and regulation of mucosal immunity." *Immunology* **142**(1): 24-31.
- McFall-Ngai M., Hadfield M. G., Bosch T. C., Carey H. V., Domazet-Loso T., Douglas A. E., Dubilier N., Eberl G., Fukami T., Gilbert S. F., Hentschel U., King N., Kjelleberg S., Knoll A. H., Kremer N., Mazmanian S. K., Metcalf J. L., Neelson K., Pierce N. E., Rawls J. F., Reid A., Ruby E. G., Rumpho M., Sanders J. G., Tautz D. et Wernegreen J. J.** (2013). "Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**(9): 3229-3236.
- McGuckin M. A., Lindén S. K., Sutton P. et Florin T. H.** (2011). "Mucin dynamics and enteric pathogens." *Nature reviews. Microbiology*. **9**(4): 265-278.
- McNeil N. I.** (1984). "The contribution of the large intestine to energy supplies in man." *The American journal of clinical nutrition* **39**(2): 338-342.
- Meddings J.** (2008). "The significance of the gut barrier in disease." *Gut* **57**(4): 438-440.
- Medzhitov R.** (2007). "Recognition of microorganisms and activation of the immune response." *Nature* **449**(7164): 819-826.
- Meijerink M. et Wells J. M.** (2010). "Probiotic modulation of dendritic cells and T cell responses in the intestine." *Beneficial microbes* **1**(4): 317-326.
- Melmed G., Thomas L. S., Lee N., Tesfay S. Y., Lukasek K., Michelsen K. S., Zhou Y., Hu B., Arditi M. et Abreu M. T.** (2003). "Human intestinal epithelial cells are broadly unresponsive to Toll-like receptor 2-dependent bacterial ligands: implications for host-microbial interactions in the gut." *The journal of immunology* **170**(3): 1406-1415.
- Mestecky J., Lamm M. E., Ogra P. L., Strober W., Bienenstock J., McGhee J. R. et Mayer L.** (2005). *Mucosal immunology*, Academic Press.
- Miettinen M., Vuopio-Varkila J. et Varkila K.** (1996). "Production of human tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-10 is induced by lactic acid bacteria." *Infection and immunity* **64**(12): 5403-5405.

- Millard A. L., Mertes P. M., Ittelet D., Villard F., Jeannesson P. et Bernard J. (2002). "Butyrate affects differentiation, maturation and function of human monocyte-derived dendritic cells and macrophages." *Clinical and experimental immunology* **130**(2): 245-255.
- Mitsuoka T. (1992). "Intestinal flora and aging." *Nutrition reviews* **50**(12): 438-446.
- Mizubuchi H., Yajima T., Aoi N., Tomita T. et Yoshikai Y. (2005). "Isomaltoligosaccharides polarize Th1-like responses in intestinal and systemic immunity in mice." *The Journal of nutrition* **135**(12): 2857-2861.
- Mohamadzadeh M., Pfeiler E. A., Brown J. B., Zadeh M., Gramarossa M., Managlia E., Bere P., Sarraj B., Khan M. W. et Pakanati K. C. (2011). "Regulation of induced colonic inflammation by *Lactobacillus acidophilus* deficient in lipoteichoic acid." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**(Supplement 1): 4623-4630.
- Morales M. L., Gonzalez A. G. et Troncoso A. M. (1998). "Ion-exclusion chromatographic determination of organic acids in vinegars." *Journal of chromatography* **822**(1): 45-51.
- Morath S., Geyer A. et Hartung T. (2001). "Structure–function relationship of cytokine induction by lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus*." *The Journal of experimental medicine* **193**(3): 393-398.
- Morath S., Geyer A., Spreitzer I., Hermann C. et Hartung T. (2002). "Structural decomposition and heterogeneity of commercial lipoteichoic acid preparations." *Infection and immunity* **70**(2): 938-944.
- Morath S., Stadelmaier A., Geyer A., Schmidt R. R. et Hartung T. (2002). "Synthetic lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* is a potent stimulus of cytokine release." *The Journal of experimental medicine* **195**(12): 1635-1640.
- Morath S., von Aulock S. et Hartung T. (2005). "Structure/function relationships of lipoteichoic acids." *Journal of endotoxin research* **11**(6): 348-356.
- Mortensen P. B. et Clausen M. R. (1996). "Short-chain fatty acids in the human colon: relation to gastrointestinal health and disease." *Scandinavian journal of gastroenterology. Supplement.* **216**: 132-148.
- Mowat A. M. (2003). "Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens." *Nature reviews. Immunology.* **3**(4): 331-341.
- Nagpal R., Kumar A., Kumar M., Behare P., Jain S. et Yadav H. (2012). "Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review." *FEMS microbiology letters* **334**(1): 1-15.
- Nakamura Y., Nosaka S., Suzuki M., Nagafuchi S., Takahashi T., Yajima T., Takenouchi-Ohkubo N., Iwase T. et Moro I. (2004). "Dietary fructooligosaccharides up-regulate immunoglobulin A response and polymeric immunoglobulin receptor expression in intestines of infant mice." *Clinical and experimental immunology* **137**(1): 52-58.
- Navarre W. W. et Schneewind O. (1999). "Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope." *Microbiology and molecular biology reviews* **63**(1): 174-229.
- Neuhaus F. C. et Baddiley J. (2003). "A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in Gram-positive bacteria." *Microbiology and molecular biology reviews* **67**(4): 686-723.
- Ng S. C., Hart A. L., Kamm M. A., Stagg A. J. et Knight S. C. (2009). "Mechanisms of action of probiotics: recent advances." *Inflammatory bowel diseases* **15**(2): 300-310.

- Nieuwdorp M., Gilijamse P. W., Pai N. et Kaplan L. M.** (2014). "Role of the microbiome in energy regulation and metabolism." *Gastroenterology* **146**(6): 1525-1533.
- Nilsen N. J., Deininger S., Nonstad U., Skjeldal F., Husebye H., Rodionov D., von Aulock S., Hartung T., Lien E. et Bakke O.** (2008). "Cellular trafficking of lipoteichoic acid and Toll-like receptor 2 in relation to signaling; role of CD14 and CD36." *Journal of leukocyte biology* **84**(1): 280-291.
- Nista E. C., Candelli M., Cremonini F., Cazzato I. A., Zocco M. A., Franceschi F., Cammarota G., Gasbarrini G. et Gasbarrini A.** (2004). "*Bacillus clausii* therapy to reduce side-effects of anti-*Helicobacter pylori* treatment: randomized, double-blind, placebo controlled trial." *Alimentary pharmacology & therapeutics*. **20**(10): 1181-1188.
- Novelli A., Ulivelli A., Reali E. F., Mannelli F., Trombi B. L., Spezia R. et Periti P.** (1984). "*Bacillus subtilis* spores as a natural pro-host oral agent. Preliminary data in children." *Chemioterapia: international journal of the Mediterranean Society of Chemotherapy* **3**(3): 152-155.
- O'Hara A. M. et Shanahan F.** (2006). "The gut flora as a forgotten organ." *EMBO reports* **7**(7): 688-693.
- Olah A., Belagyi T., Poto L., Romics Jr L. et Bengmark S.** (2007). "Synbiotic control of inflammation and infection in severe acute pancreatitis: a prospective, randomized, double blind study." *Hepato-gastroenterology* **54**(74): 590-594.
- Opitz B., Schröder N. W. J., Spreitzer I., Michelsen K. S., Kirschning C. J., Hallatschek W., Zähringer U., Hartung T., Göbel U. B. et Schumann R. R.** (2001). "Toll-like receptor-2 mediates *Treponema* glycolipid and lipoteichoic acid-induced NF- κ B translocation." *Journal of biological chemistry* **276**(25): 22041-22047.
- Otte J.-M. et Podolsky D. K.** (2004). "Functional modulation of enterocytes by Gram-positive and Gram-negative microorganisms." *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*. **286**(4): G613-G626.
- Ouwehand A. C., Salminen S. et Isolauri E.** (2002). "Probiotics: an overview of beneficial effects." *Antonie Van Leeuwenhoek* **82**(1-4): 279-289.
- Palframan R. J., Gibson G. R. et Rastall R. A.** (2003). "Carbohydrate preferences of *Bifidobacterium* species isolated from the human gut." *Current issues in intestinal microbiology* **4**(2): 71-75.
- Patel A. K., Ahire J. J., Pawar S. P., Chaudhari B. L. et Chincholkar S. B.** (2009). "Comparative accounts of probiotic characteristics of *Bacillus* spp. isolated from food wastes." *Food research international*. **42**(4): 505-510.
- Patel A. K., Deshattiwar M. K., Chaudhari B. L. et Chincholkar S. B.** (2009). "Production, purification and chemical characterization of the catecholate siderophore from potent probiotic strains of *Bacillus* spp." *Bioresource technology* **100**(1): 368-373.
- Patel A. K., Singhanian R. R., Pandey A. et Chincholkar S. B.** (2010). "Probiotic bile salt hydrolase: current developments and perspectives." *Applied biochemistry and biotechnology* **162**(1): 166-180.
- Pathmakanthan S., Walsh M., Bengmark S., Willemse P. J. et Bardhan K.** (2002). "Efficacy and tolerability treating acute distal ulcerative colitis with synbiotic enema's: a pilot trial." *Gut* **51**(Suppl III): A307.
- Perrin S., Grill J. P. et Schneider F.** (2000). "Effects of fructooligosaccharides and their monomeric components on bile salt resistance in three species of bifidobacteria." *Journal of applied microbiology* **88**(6): 968-974.

- Peschel A.** (2002). "How do bacteria resist human antimicrobial peptides?" *Trends in microbiology* **10**(4): 179-186.
- Pierre F., Perrin P., Champ M., Bornet F., Meflah K. et Menanteau J.** (1997). "Short-chain fructo-oligosaccharides reduce the occurrence of colon tumors and develop gut-associated lymphoid tissue in Min mice." *Cancer research* **57**(2): 225-228.
- Pinchuk I. V., Bressollier P., Verneuil B., Fenet B., Sorokulova I. B., Mégraud F. et Urdaci M. C.** (2001). "In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of the probiotic strain *Bacillus subtilis* 3 is due to secretion of antibiotics." *Antimicrobial agents and chemotherapy* **45**(11): 3156-3161.
- Pooley H. M., Merchante R. et Karamata D.** (1996). "Overall protein content and induced enzyme components of the periplasm of *Bacillus subtilis*." *Microbial drug resistance* **2**(1): 9-15.
- Purchiaroni F., Tortora A., Gabrielli M., Bertucci F., Gigante G., Ianiro G., Ojetti V., Scarpellini E. et Gasbarrini A.** (2013). "The role of intestinal microbiota and the immune system." *European review for medical and pharmacological sciences*. **17**(3): 323-333.
- Pyar H., Liong M.-T. et Peh K. K.** (2013). "Recent advances in probiotics and biomedical applications." *The Journal of Medical Sciences* **13**(8): 601-614.
- Rakoff-Nahoum S., Paglino J., Eslami-Varzaneh F., Edberg S. et Medzhitov R.** (2004). "Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis." *Cell* **118**(2): 229-241.
- Rambaud J.-C., Buts J.-P. et Corthier G.** (2004). *Flore microbienne intestinale: Physiologie et pathologie digestives*, John Libbey Eurotext.
- Ramos H. C., Hoffmann T., Marino M., Nedjari H., Presecan-Siedel E., Dreesen O., Glaser P. et Jahn D.** (2000). "Fermentative metabolism of *Bacillus subtilis*: physiology and regulation of gene expression." *Journal of bacteriology* **182**(11): 3072-3080.
- Ray A., Cot M., Puzo G., Gilleron M. et Nigou J.** (2013). "Bacterial cell wall macroamphiphiles: pathogen-/microbe-associated molecular patterns detected by mammalian innate immune system." *Biochimie* **95**(1): 33-42.
- Rayes N., Seehofer D., Theruvath T., Schiller R. A., Langrehr J. M., Jonas S., Bengmark S. et Neuhaus P.** (2005). "Supply of pre- and probiotics reduces bacterial infection rates after liver transplantation--a randomized, double-blind trial." *American journal of transplantation* **5**(1): 125-130.
- Rescigno M., Urbano M., Valzasina B., Francolini M., Rotta G., Bonasio R., Granucci F., Kraehenbuhl J.-P. et Ricciardi-Castagnoli P.** (2001). "Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria." *Nature immunology* **2**(4): 361-367.
- Reséndiz-Albor A. A., Esquivel R., López-Revilla R., Verdín L. et Moreno-Fierros L.** (2005). "Striking phenotypic and functional differences in lamina propria lymphocytes from the large and small intestine of mice." *Life sciences* **76**(24): 2783-2803.
- Reshef L., Niv J. et Shapiro B.** (1967). "Effect of propionate on lipogenesis in adipose tissue." *Journal of lipid research* **8**(6): 682-687.
- Roberfroid M. B.** (2005). "Introducing inulin-type fructans." *British journal of nutrition* **93** Suppl 1: S13-25.
- Roberfroid M. B.** (2007). "Inulin-type fructans: functional food ingredients." *The Journal of nutrition* **137**(11): 2493S-2502S.

- Roethlisberger P., Lida-Tanaka N., Hollemeyer K., Heinzle E., Ishizuka I. et Fischer W.** (2000). "Unique poly (glycerophosphate) lipoteichoic acid and the glycolipids of a *Streptococcus* sp. closely related to *Streptococcus pneumoniae*." *European journal of biochemistry* **267**(17): 5520-5530.
- Rolfe R. D.** (2000). "The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health." *The Journal of nutrition* **130**(2): 396S-402S.
- Romagnani S.** (2007). "Coming back to a missing immune deviation as the main explanatory mechanism for the hygiene hypothesis." *Journal of allergy and clinical immunology* **119**: 1511-1513.
- Rook G. A.** (2010). "99th Dahlem conference on infection, inflammation and chronic inflammatory disorders: Darwinian medicine and the 'hygiene' or 'old friends' hypothesis." *Clinical and experimental immunology* **160**(1): 70-79.
- Rook G. A.** (2013). "Regulation of the immune system by biodiversity from the natural environment: An ecosystem service essential to health." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**(46): 18360-18367.
- Rook G. A., Raison C. L. et Lowry C. A.** (2014). "Microbial 'old friends', immunoregulation and socioeconomic status." *Clinical and experimental immunology* **177**(1): 1-12.
- Ropartz D., Bodet P.-E., Przybylski C., Gonnet F., Daniel R., Fer M., Helbert W., Bertrand D. et Rogniaux H.** (2011). "Performance evaluation on a wide set of matrix-assisted laser desorption/ionization matrices for the detection of oligosaccharides in a high-throughput mass spectrometric screening of carbohydrate depolymerizing enzymes." *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **25**(14): 2059-2070.
- Rowland I. R., Rumney C. J., Coutts J. T. et Lievens L. C.** (1998). "Effect of *Bifidobacterium longum* and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats." *Carcinogenesis* **19**(2): 281-285.
- Roy M.-J., Dionne S., Marx G., Qureshi I., Sarma D., Levy E. et Seidman E. G.** (2009). "In vitro studies on the inhibition of colon cancer by butyrate and carnitine." *Nutrition* **25**(11): 1193-1201.
- Ruas-Madiedo P., Gueimonde M., Margolles A., de los Reyes-Gavilán C. G. et Salminen S.** (2006). "Exopolysaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to human intestinal mucus." *Journal of Food Protection*® **69**(8): 2011-2015.
- Ruas-Madiedo P., Hernández-Barranco A., Margolles A. et Clara G.** (2005). "A bile salt-resistant derivative of *Bifidobacterium animalis* has an altered fermentation pattern when grown on glucose and maltose." *Applied and environmental microbiology* **71**(11): 6564-6570.
- Ruiz L., Margolles A. et Sánchez B.** (2013). "Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*." *Frontiers in microbiology* **4**.
- Ruiz L., O'Connell-Motherway M., Zomer A., de los Reyes-Gavilán C. G., Margolles A. et Van Sinderen D.** (2012). "A bile-inducible membrane protein mediates bifidobacterial bile resistance." *Microbial biotechnology* **5**(4): 523-535.
- Rutgeerts P., D'Haens G., Baert F., Van Assche G., Aerden I., Noman M., Vermeire S. et Bengmark S.** (2004). *Randomized placebo controlled trial of pro-and prebiotics (synbiotics cocktail) for maintenance of infliximab induced remission of luminal Crohn's disease (CD)*. Digestive Disease Week/105th Annual Meeting of the American-Gastroenterological-Association, New Orleans.

- Rycroft C. E., Jones M. R., Gibson G. R. et Rastall R. A. (2001). "A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides." *Journal of applied microbiology* **91**(5): 878-887.
- 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. et Ju H. R. (2009). "Differential immunostimulatory effects of Gram-positive bacteria due to their lipoteichoic acids." *International immunopharmacology* **9**(1): 127-133.
- Saad N., Villéger R., Ouk T.-S., Delattre C., Urdaci M. et Bressollier P. (2014). Probiotics, prebiotics, and synbiotics for gut health benefits. *Beneficial Microbes in Fermented and Functional Foods*, Taylor & Francis Group: 363-386.
- Säemann M. D., Böhmig G. A., Österreicher C. H., Burtscher H., Parolini O., Diakos C., Stöckl J., Hörl W. H. et Zlabinger G. J. (2000). "Anti-inflammatory effects of sodium butyrate on human monocytes: potent inhibition of IL-12 and up-regulation of IL-10 production." *The FASEB Journal* **14**(15): 2380-2382.
- Säemann M. D., Parolini O., Böhmig G. A., Kelemen P., Krieger P.-M., Neumüller J., Knarr K., Kammlander W., Hörl W. H. et Diakos C. (2002). "Bacterial metabolite interference with maturation of human monocyte-derived dendritic cells." *Journal of leukocyte biology* **71**(2): 238-246.
- Saier M. H. et Shlykov M. A. (2012) "Group Translocation-PEP: PTS." *eLS. John Wiley & Sons*.
- Salen G. et Shefer S. (1983). "Bile acid synthesis." *Annual review of physiology* **45**(1): 679-685.
- Salim A. F. M., Phillips A. D. et Farthing M. J. G. (1990). "Pathogenesis of gut virus infection." *Baillière's clinical gastroenterology* **4**(3): 593-607.
- Samadi A. R., Islam R. et Huq M. I. (1983). "Replacement of intravenous therapy by oral rehydration solution in a large treatment centre for diarrhoea with dehydration." *Bulletin of the World Health Organization* **61**(3): 471.
- Sánchez B., Arias S., Chaignepain S., Denayrolles M., Schmitter J.-M., Bressollier P. et Urdaci M. C. (2009). "Identification of surface proteins involved in the adhesion of a probiotic *Bacillus cereus* strain to mucin and fibronectin." *Microbiology* **155**(5): 1708-1716.
- Sánchez B., Bressollier P. et Urdaci M. C. (2008). "Exported proteins in probiotic bacteria: adhesion to intestinal surfaces, host immunomodulation and molecular cross-talking with the host." *FEMS immunology and medical microbiology*. **54**(1): 1-17.
- Sánchez B., Champomier-Vergès M.-C., Anglade P., Baraige F., Clara G., Margolles A. et Zagorec M. (2005). "Proteomic analysis of global changes in protein expression during bile salt exposure of *Bifidobacterium longum* NCIMB 8809." *Journal of bacteriology* **187**(16): 5799-5808.
- Sánchez B., Champomier-Vergès M.-C., Stuer-Lauridsen B., Ruas-Madiedo P., Anglade P., Baraige F., Clara G., Johansen E., Zagorec M. et Margolles A. (2007). "Adaptation and response of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* to bile: a proteomic and physiological approach." *Applied and environmental microbiology* **73**(21): 6757-6767.
- Sanchez B., Ruiz L., de los Reyes-Gavilan C. G. et Margolles A. (2007). "Proteomics of stress response in *Bifidobacterium*." *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library* **13**: 6905-6919.
- Sánchez B., Ruiz L., Gueimonde M., Ruas-Madiedo P. et Margolles A. (2013). "Adaptation of bifidobacteria to the gastrointestinal tract and functional consequences." *Pharmacological research* **69**(1): 127-136.

- Sansonetti P. J.** (2010). "To be or not to be a pathogen: that is the mucosally relevant question." *Mucosal immunology* **4**(1): 8-14.
- Scaldaferri F., Pizzoferrato M., Gerardi V., Lopetuso L. et Gasbarrini A.** (2012). "The gut barrier: new acquisitions and therapeutic approaches." *Journal of clinical gastroenterology* **46 Suppl**: S12-17.
- Scharek-Tedin L., Pieper R., Vahjen W., Tedin K., Neumann K. et Zentek J.** (2013). "*Bacillus cereus* var. Toyoi modulates the immune reaction and reduces the occurrence of diarrhea in piglets challenged with *Salmonella typhimurium* DT104." *Journal of animal science* **91**(12): 5696-5704.
- Scharek L., Altherr B. J., Tölke C. et Schmidt M. F. G.** (2007). "Influence of the probiotic *Bacillus cereus* var. toyoi on the intestinal immunity of piglets." *Veterinary immunology and immunopathology* **120**(3): 136-147.
- Scheppach W. et Weiler F.** (2004). "The butyrate story: old wine in new bottles?" *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. **7**(5): 563-567.
- Schlee M., Wehkamp J., Altenhoefer A., Oelschlaeger T. A., Stange E. F. et Fellermann K.** (2007). "Induction of human β -defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin." *Infection and immunity* **75**(5): 2399-2407.
- Schmidt R. R., Pedersen C. M., Qiao Y. et Zähringer U.** (2011). "Chemical synthesis of bacterial lipoteichoic acids: an insight on its biological significance." *Organic & biomolecular chemistry* **9**(7): 2040-2052.
- Schneewind O. et Missiakas D.** (2014). "Lipoteichoic acids, phosphate-containing polymers in the envelope of Gram-positive bacteria." *Journal of bacteriology* **196**(6): 1133-1142.
- Scholz-Ahrens K. E., Ade P., Marten B., Weber P., Timm W., Açil Y., Glüer C.-C. et Schrezenmeir J.** (2007). "Prebiotics, probiotics, and synbiotics affect mineral absorption, bone mineral content, and bone structure." *The Journal of nutrition* **137**(3): 838S-846S.
- Scholz-Ahrens K. E., Ade P., Marten B., Weber P., Timm W., Açil Y., Glüer C.-C. et Schrezenmeir J.** (2007). "Prebiotics, probiotics, and synbiotics affect mineral absorption, bone mineral content, and bone structure." *The Journal of nutrition* **137**(3): 838S-846S.
- Schönert S., Seitz S., Krafft H., Feuerbaum E.-A., Andernach I., Witz G. et Dahl M. K.** (2006). "Maltose and maltodextrin utilization by *Bacillus subtilis*." *Journal of bacteriology* **188**(11): 3911-3922.
- Schröder N. W. J., Morath S., Alexander C., Hamann L., Hartung T., Zähringer U., Göbel U. B., Weber J. R. et Schumann R. R.** (2003). "Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved." *Journal of biological chemistry* **278**(18): 15587-15594.
- Scott J. R. et Zähler D.** (2006). "Pili with strong attachments: Gram-positive bacteria do it differently." *Molecular microbiology* **62**(2): 320-330.
- Senesi S., Celandroni F., Tavanti A. et Ghelardi E.** (2001). "Molecular characterization and identification of *Bacillus clausii* strains marketed for use in oral bacteriotherapy." *Applied and environmental microbiology* **67**(2): 834-839.
- Sheih Y.-H., Chiang B.-L., Wang L.-H., Liao C.-K. et Gill H. S.** (2001). "Systemic immunity-enhancing effects in healthy subjects following dietary consumption of the lactic acid bacterium *Lactobacillus rhamnosus* HN001." *Journal of the American College of Nutrition* **20**(2): 149-156.

- Shen L. et Turner J. R.** (2006). "Role of epithelial cells in initiation and propagation of intestinal inflammation. Eliminating the static: tight junction dynamics exposed." *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*. **290**(4): G577-G582.
- Sherman L. A. et Savage D. C.** (1986). "Lipoteichoic acids in *Lactobacillus* strains that colonize the mouse gastric epithelium." *Applied and environmental microbiology* **52**(2): 302-304.
- Shiraishi T., Yokota S.-i., Morita N., Fukiya S., Tomita S., Tanaka N., Okada S. et Yokota A.** (2013). "Characterization of a *Lactobacillus gasseri* JCM 1131T lipoteichoic acid with a novel glycolipid anchor structure." *Applied and environmental microbiology* **79**(10): 3315-3318.
- Soldavini J. et Kaunitz J. D.** (2013). "Pathobiology and potential therapeutic value of intestinal short-chain fatty acids in gut inflammation and obesity." *Digestive diseases and sciences* **58**(10): 2756-2766.
- Soldavini J. et Kaunitz J. D.** (2013). "Pathobiology and potential therapeutic value of intestinal short-chain fatty acids in gut inflammation and obesity." *Digestive diseases and sciences* **58**(10): 2756-2766.
- Soldo B., Scotti C., Karamata D. et Lazarevic V.** (2003). "The Bacillus subtilis Gne (GneA, GalE) protein can catalyse UDP-glucose as well as UDP-N-acetylglucosamine 4-epimerisation." *Gene* **319**: 65-69.
- Solis Pereyra B. et Lemonnier D.** (1993). "Induction of human cytokines by bacteria used in dairy foods." *Nutrition Research* **13**(10): 1127-1140.
- Spindler-Vesel A., Bengmark S., Vovk I., Cerovic O. et Kompan L.** (2007). "Synbiotics, prebiotics, glutamine, or peptide in early enteral nutrition: a randomized study in trauma patients." *JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition*. **31**(2): 119-126.
- Srinivasjois R., Rao S. et Patole S.** (2009). "Prebiotic supplementation of formula in preterm neonates: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials." *Clinical Nutrition* **28**(3): 237-242.
- Stagg A. J., Hart A. L., Knight S. C. et Kamm M. A.** (2003). "The dendritic cell: its role in intestinal inflammation and relationship with gut bacteria." *Gut* **52**(10): 1522-1529.
- Stappenbeck T. S., Hooper L. V. et Gordon J. I.** (2002). "Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**(24): 15451-15455.
- Stenfors-Arnesen L. P., Fagerlund A. et Granum P. E.** (2008). "From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins." *FEMS microbiology reviews* **32**(4): 579-606.
- Strober W., Murray P. J., Kitani A. et Watanabe T.** (2005). "Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2." *Nature reviews. Immunology*. **6**(1): 9-20.
- Su L. F., Kidd B. A., Han A., Kotzin J. J. et Davis M. M.** (2013). "Virus-specific CD4(+) memory-phenotype T cells are abundant in unexposed adults." *Immunity* **38**(2): 373-383.
- Surawicz C. M.** (2003). "Probiotics, antibiotic-associated diarrhoea and *Clostridium difficile* diarrhoea in humans." *Best practice & research. Clinical gastroenterology*. **17**(5): 775-783.
- Szajewska H., Rusczyński M. et Kolacek S.** (2014). "Meta-analysis shows limited evidence for using *Lactobacillus acidophilus* LB to treat acute gastroenteritis in children." *Acta paediatrica* **103**(3): 249-255.
- Szajewska H., Skorka A., Rusczyński M. et Gieruszczak-Bialek D.** (2007). "Meta-analysis: *Lactobacillus* GG for treating acute diarrhoea in children." *Alimentary pharmacology & therapeutics*. **25**(8): 871-881.

- Tallon R., Arias S., Bressollier P. et Urdaci M. C.** (2007). "Strain- and matrix- dependent adhesion of *Lactobacillus plantarum* is mediated by proteinaceous bacterial compounds." *Journal of applied microbiology* **102**(2): 442-451.
- Tang C.-H., Hsu C.-J., Yang W.-H. et Fong Y.-C.** (2010). "Lipoteichoic acid enhances IL-6 production in human synovial fibroblasts via TLR2 receptor, PKC δ and c-Src dependent pathways." *Biochemical pharmacology* **79**(11): 1648-1657.
- Tedelind S., Westberg F., Kjerrulf M. et Vidal A.** (2007). "Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: a study with relevance to inflammatory bowel disease." *World journal of gastroenterology* **13**(20): 2826.
- Thitaram S. N., Chung C.-H., Day D. F., Hinton A., Bailey J. S. et Siragusa G. R.** (2005). "Isomaltooligosaccharide increases cecal *Bifidobacterium* population in young broiler chickens." *Poultry science* **84**(7): 998-1003.
- Tremaroli V. et Bäckhed F.** (2012). "Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism." *Nature* **489**(7415): 242-249.
- Triantafilou M., Brandenburg K., Gutschmann T., Seydel U. et Triantafilou K.** (2002). "Innate recognition of bacteria: engagement of multiple receptors." *Critical reviews in immunology* **22**(4): 251-268.
- Triantafilou M., Manukyan M., Mackie A., Morath S., Hartung T., Heine H. et Triantafilou K.** (2004). "Lipoteichoic acid and toll-like receptor 2 internalization and targeting to the Golgi are lipid raft-dependent." *Journal of biological chemistry* **279**(39): 40882-40889.
- Tunio S. A., Oldfield N. J., Berry A., Ala'Aldeen D. A., Wooldridge K. G. et Turner D. P.** (2010). "The moonlighting protein fructose-1, 6-bisphosphate aldolase of *Neisseria meningitidis*: surface localization and role in host cell adhesion." *Molecular microbiology* **76**(3): 605-615.
- Turnbaugh P. J., Ley R. E., Hamady M., Fraser-Liggett C., Knight R. et Gordon J. I.** (2007). "The human microbiome project: exploring the microbial part of ourselves in a changing world." *Nature* **449**(7164): 804.
- Turnbaugh P. J., Ley R. E., Mahowald M. A., Magrini V., Mardis E. R. et Gordon J. I.** (2006). "An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest." *Nature* **444**(7122): 1027-1131.
- Umesaki Y., Setoyama H., Matsumoto S. et Okada Y.** (1993). "Expansion of alpha beta T-cell receptor-bearing intestinal intraepithelial lymphocytes after microbial colonization in germ-free mice and its independence from thymus." *Immunology* **79**(1): 32.
- Urdaci M. C., Bressollier P. et Pinchuk I.** (2004). "*Bacillus clausii* probiotic strains: antimicrobial and immunomodulatory activities." *Journal of clinical gastroenterology* **38**(6 Suppl): S86-90.
- Vasiljevic T. et Shah N. P.** (2008). "Probiotics—from Metchnikoff to bioactives." *International Dairy Journal* **18**(7): 714-728.
- Vélez M. P., De Keersmaecker S. C. J. et Vanderleyden J.** (2007). "Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract." *FEMS microbiology letters* **276**(2): 140-148.
- Vélez M. P., Verhoeven T. L. A., Draing C., Von Aulock S., Pfitzenmaier M., Geyer A., Lambrichts I., Grangette C., Pot B. et Vanderleyden J.** (2007). "Functional analysis of D-alanylation of lipoteichoic acid in the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG." *Applied and environmental microbiology* **73**(11): 3595-3604.
- Villéger R., Saad N., Grenier K., Falourd X., Foucat L., Urdaci M., Bressollier P. et Ouk T.-s.** (2014). "Characterization of lipoteichoic acid structures from three probiotic

- Bacillus* strains: involvement of D-alanine in their biological activity." *Antonie Van Leeuwenhoek* **106**(4): 693-706.
- Walter J., Loach D. M., Alqumber M., Rockel C., Hermann C., Pfitzenmaier M. et 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." *Environmental microbiology* **9**(7): 1750-1760.
- Welman A. D. et Maddox I. S.** (2003). "Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges." *Trends in biotechnology* **21**(6): 269-274.
- Welters C. F. M., Heineman E., Thunnissen F. B. J. M., van den Bogaard A. E. J. M., Soeters P. B. et Baeten C. G. M. I.** (2002). "Effect of dietary inulin supplementation on inflammation of pouch mucosa in patients with an ileal pouch-anal anastomosis." *Diseases of the colon & rectum* **45**(5): 621-627.
- Weng M. et Walker W. A.** (2013). "The role of gut microbiota in programming the immune phenotype." *Journal of developmental origins of health and disease* **4**(03): 203-214.
- WGO** (2008). Practice Guidelines: Probiotics and Prebiotics., WGO.
- Wicken A. J. et Knox K. W.** (1975). "Lipoteichoic acids: a new class of bacterial antigen." *Science* **187**(4182): 1161-1167.
- Wobser D., Ali L., Grohmann E., Huebner J. et Sakinc T.** (2014). "A Novel Role for D-Alanylation of Lipoteichoic Acid of *Enterococcus faecalis* in Urinary Tract Infection." *PLoS One* **9**(10): e107827.
- Wolfert M. A., Roychowdhury A. et Boons G.-J.** (2007). "Modification of the structure of peptidoglycan is a strategy to avoid detection by nucleotide-binding oligomerization domain protein 1." *Infection and immunity* **75**(2): 706-713.
- Wörmann M. E., Corrigan R. M., Simpson P. J., Matthews S. J. et Gründling A.** (2011). "Enzymatic activities and functional interdependencies of *Bacillus subtilis* lipoteichoic acid synthesis enzymes." *Molecular microbiology* **79**(3): 566-583.
- Xu J., Bjursell M. K., Himrod J., Deng S., Carmichael L. K., Chiang H. C., Hooper L. V. et Gordon J. I.** (2003). "A genomic view of the human-*Bacteroides thetaiotaomicron* symbiosis." *Science* **299**(5615): 2074-2076.
- Yamamoto H., Serizawa M., Thompson J. et Sekiguchi J.** (2001). "Regulation of the *glv* operon in *Bacillus subtilis*: YfiA (GlvR) is a positive regulator of the operon that is repressed through CcpA and cre." *Journal of bacteriology* **183**(17): 5110-5121.
- Yan F., Cao H., Cover T. L., Whitehead R., Washington M. K. et Polk D. B.** (2007). "Soluble proteins produced by probiotic bacteria regulate intestinal epithelial cell survival and growth." *Gastroenterology* **132**(2): 562-575.
- Yasuda E., Serata M. et Sako T.** (2008). "Suppressive effect on activation of macrophages by *Lactobacillus casei* strain Shirota genes determining the synthesis of cell wall-associated polysaccharides." *Applied and environmental microbiology* **74**(15): 4746-4755.
- Yatsunenkov T., Rey F. E., Manary M. J., Trehan I., Dominguez-Bello M. G., Contreras M., Magris M., Hidalgo G., Baldassano R. N., Anokhin A. P., Heath A. C., Warner B., Reeder J., Kuczynski J., Caporaso J. G., Lozupone C. A., Lauber C., Clemente J. C., Knights D., Knight R. et Gordon J. I.** (2012). "Human gut microbiome viewed across age and geography." *Nature* **486**(7402): 222-227.
- Yen C.-H., Tseng Y.-H., Kuo Y.-W., Lee M.-C. et Chen H.-L.** (2011). "Long-term supplementation of isomaltooligosaccharides improved colonic microflora profile, bowel function, and blood cholesterol levels in constipated elderly people—A placebo-controlled, diet-controlled trial." *Nutrition* **27**(4): 445-450.

- Yu L. C.-H., Wang J.-T., Wei S.-C. et Ni Y.-H.** (2012). "Host-microbial interactions and regulation of intestinal epithelial barrier function: from physiology to pathology." *World journal of gastrointestinal pathophysiology* **3**(1): 27.
- Zeng H., Carlson A. Q., Guo Y., Yu Y., Collier-Hyams L. S., Madara J. L., Gewirtz A. T. et Neish A. S.** (2003). "Flagellin is the major proinflammatory determinant of enteropathogenic *Salmonella*." *The journal of immunology* **171**(7): 3668-3674.
- Zhang C.-N., Li X.-F., Xu W.-N., Jiang G.-Z., Lu K.-L., Wang L.-N. et Liu W.-B.** (2013). "Combined effects of dietary fructooligosaccharide and *Bacillus licheniformis* on innate immunity, antioxidant capability and disease resistance of triangular bream (*Megalobrama terminalis*)." *Fish & shellfish immunology* **35**(5): 1380-1386.
- Zhang Q., Yu H., Tong T., Tong W., Dong L., Xu M. et Wang Z.** (2014). "Dietary supplementation of *Bacillus subtilis* and fructooligosaccharide enhance the growth, non-specific immunity of juvenile ovate pompano, *Trachinotus ovatus* and its disease resistance against *Vibrio vulnificus*." *Fish & shellfish immunology* **38**(1): 7-14.
- Zídek Z., Farghali H. et Kmoníčková E.** (2010). "Intrinsic nitric oxide-stimulatory activity of lipoteichoic acids from different Gram-positive bacteria." *Nitric oxide* **23**(4): 300-310.
- Zocco M. A., Dal Verme L. Z., CREMONINI F., Piscaglia A. C., Nista E. C., CANDELLI M., Novi M., RIGANTE D., Cazzato I. A. et OJETTI V.** (2006). "Efficacy of *Lactobacillus* GG in maintaining remission of ulcerative colitis." *Alimentary pharmacology & therapeutics*. **23**(11): 1567-1574.
- Zyrek A. A., Cichon C., Helms S., Enders C., Sonnenborn U. et Schmidt M. A.** (2007). "Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of *Escherichia coli* Nissle 1917 involve ZO-2 and PKC ζ redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair." *Cellular microbiology* **9**(3): 804-816.

Annexes

Numéro d'accès	Protéine identifiée	Masse	pI	N° Spot	Rang	Fold	Anova (p)	Power	Score	Matches	Cover
ACON_BACSU	Aconitate hydratase OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=citB PE=1 SV=4	99272	5,09	949	2	-4,1	2,70E-05	≥ 0,9995	131	4	2%
				1020	2	2,2	0,002	0,968	69	1	0%
ACSA_BACSU	Acetyl-coenzyme A synthetase OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=acsA PE=1 SV=1	64850	5,64	1020	1	2,2	0,002	0,968	221	6	11%
				1019	1	2,7	0,01	0,827	154	4	6%
ALDH4_BACSU	Putative aldehyde dehydrogenase DhaS OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=dhaS PE=3 SV=1	53848	5,2	560	1	1,4	0,006	0,892	424	13	27%
				556	1	1,5	0,005	0,915	331	10	16%
				845	3	-1,5	0,004	0,931	101	2	4%
ALDH5_BACSU	Putative aldehyde dehydrogenase YfmT OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=yfmT PE=2 SV=1	53288	5,25	601	1	1,6	0,007	0,875	346	9	17%
ALF_BACSU	Probable fructose-bisphosphate aldolase OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=fbaA PE=1 SV=2	30381	5,19	834	2	-2,4	1,15E-04	≥ 0,9995	149	5	20%
				845	2	-1,5	0,004	0,931	108	2	8%
				1062	7	-1,4	0,015	0,759	45	1	4%
ARGI_BACSU	Arginase OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=rocF PE=1 SV=1	32134	5,1	1062	2	-1,4	0,015	0,759	149	4	17%
ARTP_BACSU	Arginine-binding extracellular protein ArtP OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=artP PE=1 SV=1	28294	5,28	867	2	2,2	0,002	0,975	110	2	8%
ATPA_BACSU	ATP synthase subunit alpha OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=atpA PE=1 SV=3	54565	5,22	729	1	-1,5	0,019	0,727	269	6	14%
ATPB_BACSU	ATP synthase subunit beta OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=atpD PE=1 SV=1	51388	4,8	878	1	-2,1	0,003	0,941	253	6	18%
				873	2	-1,5	0,018	0,734	136	3	7%
AZOR2_BACSU	FMN-dependent NADH-azoreductase 2 OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=azoR2 PE=1 SV=1	23257	5,26	923	3	-1,9	0,002	0,971	126	2	11%
BDHA_BACSU	(R,R)-butanediol dehydrogenase OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=bdhA PE=3 SV=1	37318	4,99	873	1	-1,5	0,018	0,734	234	3	13%
				706	2	-1,6	0,006	0,890	138	3	10%

Numéro d'accès	Protéine identifiée	Masse	pI	N° Spot	Rang	Fold	Anova (p)	Power	Score	Matches	Cover
CH60_BACSU	60 kDa chaperonin OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=groL PE=1 SV=3	57389	4,73	528	1	1,7	0,03	0,638	830	17	38%
				1073	1	-1,6	0,022	0,696	799	14	35%
				692	1	-2,1	0,016	0,757	271	7	20%
				564	1	2,5	0,006	0,887	245	6	15%
				760	1	-1,8	0,005	0,900	220	6	8%
				939	1	-1,8	0,026	0,666	162	4	8%
				706	3	-1,6	0,006	0,890	82	1	3%
CODY_BACSU	GTP-sensing transcriptional pleiotropic repressor CodY OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=codY PE=1 SV=3	28995	4,95	878	2	-2,1	0,003	0,941	148	3	15%
COTN_BACSU	Spore coat-associated protein N OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=tasA PE=1 SV=1	28287	5,58	1062	1	-1,4	0,015	0,759	292	9	24%
DACA_BACSU	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase DacA OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=dacA PE=1 SV=3	48606	5,77	729	7	-1,5	0,019	0,727	75	2	4%
DEOC_BACSU	Deoxyribose-phosphate aldolase OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=deoC PE=3 SV=3	23246	5,04	873	3	-1,5	0,018	0,734	73	2	8%
DHA_BACSU	Alanine dehydrogenase OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=ald PE=1 SV=1	39659	5,28	834	1	-2,4	1,15E-04	≥ 0,9995	356	8	22%
				669	1	-2,2	3,93E-04	0,998	208	6	21%
				845	1	-1,5	0,004	0,931	145	3	9%
				729	5	-1,5	0,019	0,727	108	2	6%
DHNA_BACSU	NADH dehydrogenase OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=ahpF PE=1 SV=2	54840	4,89	609	2	2,2	4,25E-04	0,998	72	1	1%
DNAK_BACSU	Chaperone protein DnaK OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=dnaK PE=1 SV=3	65962	4,76	483	1	-1,7	0,005	0,911	324	9	19%
				692	3	-2,1	0,016	0,757	207	7	16%
				1062	4	-1,4	0,015	0,759	77	2	3%
EFG_BACSU	Elongation factor G OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=fusA PE=1 SV=3	76569	4,8	412	1	-3,3	2,96E-05	≥ 0,9995	67	1	1%
				692	2	-2,1	0,016	0,757	241	6	9%
				792	2	-1,5	0,002	0,970	77	1	2%

Numéro d'accès	Protéine identifiée	Masse	pI	N° Spot	Rang	Fold	Anova (p)	Power	Score	Matches	Cover
EFTU_BACSU	Elongation factor Tu OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=tuf PE=3 SV=1	43566	4,92	1022	1	-3,3	5,36E-05	≥ 0,9995	313	8	16%
				792	1	-1,5	0,002	0,970	121	2	5%
				692	4	-2,1	0,016	0,757	123	2	7%
ENO_BACSU	Enolase OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=eno PE=1 SV=4	46552	4,68	692	5	-2,1	0,016	0,757	85	3	4%
FLA_BACSU	Flagellin OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=hag PE=1 SV=2	32607	4,97	760	1	-1,8	0,005	0,900	191	3	13%
FOLD_BACSU	Bifunctional protein FoID OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=foID PE=3 SV=1	30666	5,67	834	5	-2,4	1,15E-04	≥ 0,9995	46	1	3%
				845	6	-1,5	0,004	0,931	58	1	4%
FUMC_BACSU	Fumarate hydratase class II OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=fumC PE=3 SV=2	50500	5,57	669	3	-2,2	3,93E-04	0,998	78	2	5%
G3P1_BACSU	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1 OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=gapA PE=1 SV=2	35810	5,2	1042	1	-2	0,003	0,947	213	5	11%
				939	2	-1,8	0,026	0,666	99	3	5%
GALE_BACSU	UDP-glucose 4-epimerase OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=gale PE=3 SV=1	36986	4,98	741	1	1,5	0,002	0,977	107	2	5%
GATB_BACSU	Aspartyl/glutamyl-tRNA(Asn/Gln) amidotransferase subunit B OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=gatB PE=1 SV=2	53520	5,09	600	1	1,7	0,001	0,981	310	9	22%
GLNA_BACSU	Glutamine synthetase OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=glnA PE=1 SV=3	50246	5,05	894	2	-2,9	1,85E-04	≥ 0,9995	92	3	4%
				1062	3	-1,4	0,015	0,759	117	3	6%
GLVA_BACSU	Maltose-6~phosphate glucosidase OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=glvA PE=1 SV=1	50481	4,93	609	1	2,2	4,25E-04	0,998	939	22	42%
				599	1	2,3	3,14E-04	0,999	397	10	24%
				600	2	1,7	0,001	0,981	57	1	2%

Numéro d'accès	Protéine identifiée	Masse	pI	N° Spot	Rang	Fold	Anova (p)	Power	Score	Matches	Cover
GLYA_BACSU	Serine hydroxymethyltransferase OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=glyA PE=1 SV=1	45461	5,56	734	1	-2,3	0,012	0,801	157	4	8%
				949	1	-4,1	2,70E-05	≥ 0,9995	148	4	10%
IDH_BACSU	Isocitrate dehydrogenase [NADP] OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=icd PE=1 SV=1	46389	5,03	894	1	-2,9	1,85E-04	≥ 0,9995	118	3	8%
				923	4	-1,9	0,002	0,971	72	2	5%
				1062	5	-1,4	0,015	0,759	74	2	4%
IOLA_BACSU	Methylmalonate semialdehyde dehydrogenase [acylating] OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=iolA PE=1 SV=1	53419	5,24	586	1	2,1	5,29E-05	≥ 0,9995	161	6	12%
KCY_BACSU	Cytidylate kinase OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=cmk PE=1 SV=1	25081	5,19	867	1	2,2	0,002	0,975	309	8	40%
LDH_BACSU	L-lactate dehydrogenase OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=ldh PE=1 SV=3	34780	5,49	729	6	-1,5	0,019	0,727	83	1	4%
LICH_BACSU	Probable 6-phospho-beta-glucosidase OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=lich PE=2 SV=1	48680	5,35	1047	1	2	0,002	0,975	329	14	27%
				1048	1	1,7	0,022	0,696	241	7	18%
				867	3	2,2	0,002	0,975	58	1	4%
MDH_BACSU	Malate dehydrogenase OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=mdh PE=1 SV=3	33623	4,92	1073	2	-1,6	0,022	0,696	246	5	15%
				760	2	-1,8	0,005	0,900	106	2	6%
METE_BACSU	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=metE PE=1 SV=4	86753	5,09	601	2	1,6	0,007	0,875	81	1	1%
MURE_BACSU	UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate--2,6-diaminopimelate ligase OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=murE PE=3 SV=1	54292	5,63	1012	1	2,1	0,003	0,946	188	5	11%
NAMA_BACSU	NADPH dehydrogenase OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=namA PE=1 SV=3	37560	5,28	729	4	-1,5	0,019	0,727	114	2	5%

Numéro d'accès	Protéine identifiée	Masse	pI	N° Spot	Rang	Fold	Anova (p)	Power	Score	Matches	Cover
OPUCA_BACSU	Glycine betaine/carnitine/choline transport ATP-binding protein OpuCA OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=opuCA PE=1 SV=1	43220	6,51	923	2	-1,9	0,002	0,971	217	5	17%
OXDC_BACSU	Oxalate decarboxylase OxdC OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=oxdC PE=1 SV=1	43539	5,25	669	2	-2,2	3,93E-04	0,998	153	5	15%
PDXS_BACSU	Pyridoxal biosynthesis lyase PdxS OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=pxdS PE=1 SV=3	31591	5,26	923	1	-1,9	0,002	0,971	542	10	35%
				915	2	-2	2,88E-05	≥ 0,9995	108	3	5%
PGCA_BACSU	Phosphoglucomutase OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=pgcA PE=1 SV=3	64623	5,03	458	1	1,4	0,02	0,713	82	3	4%
PGK_BACSU	Phosphoglycerate kinase OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=pgk PE=1 SV=3	42164	4,96	706	1	-1,6	0,006	0,890	279	8	28%
PKSG_BACSU	Polyketide biosynthesis 3-hydroxy-3-methylglutaryl-ACP synthase PksG OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=pksG PE=1 SV=2	46750	5,3	1047	2	2	0,002	0,975	83	2	4%
				601	3	1,6	0,007	0,875	52	1	2%
PT1_BACSU	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=ptsI PE=1 SV=3	63039	4,78	1073	3	-1,6	0,022	0,696	103	1	2%
PUR9_BACSU	Bifunctional purine biosynthesis protein PurH OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=purH PE=3 SV=2	55719	5,28	834	4	-2,4	1,15E-04	≥ 0,9995	46	2	6%
PYC_BACSU	Pyruvate carboxylase OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=pyc PE=3 SV=1	127856	5,53	1062	6	-1,4	0,015	0,759	48	1	1%
QUEA_BACSU	S-adenosylmethionine:tRNA ribosyltransferase-isomerase OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=queA PE=1 SV=1	38488	5,21	729	2	-1,5	0,019	0,727	133	4	10%
RPOA_BACSU	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=rpoA PE=1 SV=1	34778	4,8	893	1	-1,4	0,012	0,795	233	5	16%

Numéro d'accès	Protéine identifiée	Masse	pI	N° Spot	Rang	Fold	Anova (p)	Power	Score	Matches	Cover
SDHA_BACSU	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=sdhA PE=3 SV=4	65110	5,77	518	1	1,5	0,002	0,976	832	23	36%
SYFB_BACSU	Phenylalanine--tRNA ligase beta subunit OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=pheT PE=3 SV=2	87891	5,05	326	1	1,9	0,035	0,601	448	8	11%
SYGB_BACSU	Glycine--tRNA ligase beta subunit OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=glyS PE=3 SV=2	76243	5,21	1055	1	1,6	0,011	0,806	274	6	8%
SYL_BACSU	Leucine--tRNA ligase OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=leuS PE=3 SV=3	91485	5,03	326	2	1,9	0,035	0,601	127	3	5%
SYM_BACSU	Methionine--tRNA ligase OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=metG PE=3 SV=1	76140	5,14	1076	1	2,1	0,023	0,690	304	10	15%
THIM_BACSU	Hydroxyethylthiazole kinase OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=thiM PE=1 SV=1	28196	5,49	834	3	-2,4	1,15E-04	≥ 0,9995	82	1	4%
THRC_BACSU	Threonine synthase OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=thrC PE=3 SV=1	37440	5,34	729	3	-1,5	0,019	0,727	132	3	10%
YITJ_BACSU	Bifunctional homocysteine S-methyltransferase/5,10-methylenetetrahydrofolate reductase OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=yitJ PE=2 SV=1	67885	5,46	1039	1	1,7	0,013	0,785	558	13	25%
YJJA_BACSU	Uncharacterized protein YjjA OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=yjjA PE=4 SV=1	29818	5,34	845	5	-1,5	0,004	0,931	69	2	10%
YKWC_BACSU	Uncharacterized oxidoreductase YkwC OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=ykwC PE=3 SV=1	30692	5,28	845	4	-1,5	0,004	0,931	90	1	5%
YQJE_BACSU	Uncharacterized protein YqjE OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=yqjE PE=3 SV=2	39622	4,95	915	1	-2	2,88E-05	≥ 0,9995	148	3	6%
				878	3	-2,1	0,003	0,941	49	1	2%
YUFN_BACSU	Uncharacterized lipoprotein YufN OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=yufN PE=3 SV=2	38338	5,26	956	1	-2,1	1,49E-04	≥ 0,9995	110	2	12%

Numéro d'accès	Protéine identifiée	Masse	pI	N° Spot	Rang	Fold	Anova (p)	Power	Score	Matches	Cover
	NI			868		-3,2	4,53E-04	0,997			
	NI			940		-1,9	7,01E-04	0,994			
	NI			785		-1,7	8,94E-04	0,991			
	NI			515		1,5	0,002	0,961			
	NI			1057+1058		2,1	0,005				
	NI			1030		1,6	0,03	0,637			

Publication

Characterization of lipoteichoic acid structures from three probiotic *Bacillus* strains: involvement of D-alanine in their biological activity

Romain Villéger · Naima Saad · Karine Grenier ·
Xavier Falourd · Loïc Foucat · Maria C. Urdaci ·
Philippe Bressollier · Tan-Sothea Ouk

Received: 22 April 2014 / Accepted: 17 July 2014 / Published online: 5 August 2014
© The Author(s) 2014. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract Probiotics represent a potential strategy to influence the host's immune system thereby modulating immune response. Lipoteichoic Acid (LTA) is a major immune-stimulating component of Gram-positive cell envelopes. This amphiphilic polymer, anchored in the cytoplasmic membrane by means of its glycolipid component, typically consists of a poly (glycerol-phosphate) chain with D-alanine and/or glycosyl substitutions. LTA is known to stimulate macrophages in vitro, leading to secretion of inflammatory mediators such as Nitric Oxide (NO). This study investigates the structure–activity relationship of purified LTA from three probiotic *Bacillus* strains (*Bacillus cereus* CH, *Bacillus subtilis* CU1 and *Bacillus clausii* O/C). LTAs were extracted from bacterial cultures and purified. Chemical modification by means of hydrolysis at pH 8.5 was performed to

remove D-alanine. The molecular structure of native and modified LTAs was determined by ¹H NMR and GC–MS, and their inflammatory potential investigated by measuring NO production by RAW 264.7 macrophages. Structural analysis revealed several differences between the newly characterized LTAs, mainly relating to their D-alanylation rates and poly (glycerol-phosphate) chain length. We observed induction of NO production by LTAs from *B. subtilis* and *B. clausii*, whereas weaker NO production was observed with *B. cereus*. LTA dealanylation abrogated NO production independently of the glycolipid component, suggesting that immunomodulatory potential depends on D-alanine substitutions. D-alanine may control the spatial configuration of LTAs and their recognition by cell receptors. Knowledge of molecular mechanisms behind the immunomodulatory abilities of probiotics is essential to optimize their use.

R. Villéger · N. Saad · K. Grenier · P. Bressollier ·
T.-S. Ouk (✉)
Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, EA
1069, Antenne IUT, Département Génie Biologique,
Allée André Maurois, 87065 Limoges, France
e-mail: tan-sothea.ouk@unilim.fr

X. Falourd · L. Foucat
UMR 1268 Biopolymères Interactions Assemblages,
INRA, 44316 Nantes, France

M. C. Urdaci · P. Bressollier · T.-S. Ouk
UMR 5248, Université de Bordeaux-Bordeaux Sci Agro,
Microbiology Lab, 1 cours du Général de Gaulle,
33175 Gradignan, France

Keywords Lipoteichoic acid · Probiotics ·
Immunomodulation · Structure–activity relationship

Introduction

Beneficial effects of probiotic bacteria, notably immunomodulatory effects, have been attributed to cell envelope molecules interacting with intestinal cells (Lebeer et al. 2010). Among them, Lipoteichoic Acid (LTA) is a major constituent of Gram-positive bacteria

cell envelopes and is considered as the counterpart of Gram-negative Lipopolysaccharide (LPS) (Weidenmaier and Peschel 2008; Wicken and Knox 1975). Many studies have described LTA to be an important factor for inflammation induced by pathogenic bacteria (Deininger et al. 2008; Ginsburg 2002), but also in immunomodulation mediated by probiotics. Although the nature of Pattern Recognition Receptors (PRR) involved in their recognition is still controversial (Ray et al. 2013), LTAs are described as ligands for TLR2 in a heterodimer with TLR6, with CD14 and CD36 as co-receptors (Nilsen et al. 2008; Schröder et al. 2003; Schwandner et al. 1999). Interaction between LTA and host cell PRR leads to induction of the NF- κ B pathway, followed by production of pro-inflammatory mediators such as cytokines or Nitric Oxide (NO) (Hsiao et al. 2004; Kengatharan et al. 1996; Lebeer et al. 2012). However, the mechanisms underlying these effects are currently not well understood.

LTA is an amphiphilic glycopolymer, the most common structure of which in *Staphylococcus* and *Bacillus* strains is composed of a hydrophilic chain of poly (glycerol-phosphate) units, substituted with D-alanine and/or sugars, and covalently linked to β -gentiobiosyldiacylglycerol. This latter acts as a lipid anchor inserted into the plasma membrane, while the backbone chain extends into the peptidoglycan to the bacterial surface (Neuhaus and Baddiley 2003; Reichmann and Gründling 2011). Studies have shown variability in the LTA structure, depending on the bacterial strain. These variations, which mainly concern the length of the hydrophilic backbone (from 10 to 60 glycerol-phosphate units on average), the substitution rate with D-alanine (almost nothing to 80 % of the glycerol-phosphate units) and the fatty acid constituents of the hydrophobic anchor (13:0 in average). These different variations could modify the interactions with cell receptors and consequently, could lead to differences in the induced immunological responses. Currently, studies of structure–activity relationships are needed to highlight the exact role of each part of LTA in its biological activity. This has been mainly studied in *Staphylococcus aureus* given the involvement of this organism in sepsis, whereas LTAs from probiotic bacteria have been mostly described in *Lactobacillus* strains (Grangette et al. 2005; Mohamadzadeh et al. 2011; Vélez et al. 2007). LTAs from pathogenic *S. aureus* and probiotic

Lactobacillus plantarum cause different immunostimulatory effects. NO production induced by purified LTAs from the probiotic *L. plantarum* KCTC 10887BP in RAW 264.7 cells was reported to be lower than that from LTAs from pathogenic *S. aureus*, suggesting that their different effects on the immune system could be mainly caused by the distinctive structural features of their LTAs (Ryu et al. 2009). Multi-spectrometric analyses of LTA from *L. plantarum* KCTC 10887BP revealed major differences compared to *S. aureus* LTA, notably in the number and the degree of saturation of the acyl chain in the glycolipid moiety, and the types of modified sugar units in the poly (glycerol-phosphate) chains (Jang et al. 2011). Regarding the glycolipid anchor, it seems to play a critical role in biological activity of LTAs and related glycoconjugates (Baik et al. 2011; Blanc et al. 2013; Hong et al. 2014), notably because the acyl chain seems to be involved in recognition by cell receptor TLR2 (Kang et al. 2009), and necessary to induce expression of inflammatory components (Morath et al. 2002b). However, studies on the structural and functional relationship suggest that substitutions by D-alanine are mainly responsible for the immunostimulatory potential of LTAs. Beyond the role of D-alanine in cell viability, surface adhesion or protection against cationic antimicrobial peptides (Chan et al. 2007; Fittipaldi et al. 2008), Morath et al. (2001) demonstrated that a specific and complete hydrolysis of the D-alanine esters of *S. aureus* LTA led to a decrease in TNF α induction capacity in leukocytes from whole blood. Moreover, macrophage stimulation by *S. aureus* synthetic LTAs suggested that a strong cell response is dependent on a high degree of D-alanine substitutions (Deininger et al. 2003). The role of D-alanine was previously confirmed using an isogenic *L. plantarum* mutant with a complete absence of D-alanine substitution in LTA: significantly reduced levels of pro-inflammatory cytokines and enhanced levels of anti-inflammatory cytokines were observed compared to the parental strain in human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) (Grangette et al. 2005).

Lactic acid bacteria and *Bifidobacteria* are the most commonly used bacterial probiotics. Strains of some *Bacillus* species have been shown to have prophylactic health benefits for human gastrointestinal disorders, prevention of recurrent respiratory infections or as an adjunct to antibiotic use (Cutting 2011; Hong et al.

2005; Marseglia et al. 2007; Mazza 1994). The use of such *Bacillus* strains as probiotics represents a real interest in dietary supplementation for their ability to induce immune stimulation and produce antimicrobial compounds, which is favoured by their ability to survive at a low gastric pH in a spore form (Cutting 2011; Urdaci et al. 2004). Furthermore, studies have shown that spores of probiotic *Bacillus* strains are able to germinate and grow within the intestinal tract, and possibly be considered as temporary residents (Casula and Cutting 2002; Duc et al. 2003; Leser et al. 2008). Effects on immunomodulation occur through the interaction and stimulation of Gut-associated Lymphoid Tissue (GALT), resulting in cytokine production. A previous study showed that the cell wall components from a probiotic *Bacillus* strain (*Bacillus coagulans* GBI-30) have immunomodulatory properties (Jensen et al. 2010).

In our study, we aimed to compare the structure and biological activity of LTAs from three *Bacillus* strains commercially sold as probiotic preparations for human use: *Bacillus cereus* CH (Anyang Yuanshou Biodrug Ltd., China), *Bacillus subtilis* CU1 (Probis[®]BS, Lesaffre, France) and *Bacillus clausii* O/C (Enterogermina[®], Sanofi Aventis, Italy). More specifically we aimed to determine the role of D-alanine substitution on the immunological activity of LTA. Purified LTAs were characterized by ¹H NMR spectroscopy. LTA immunological activity was evaluated by measuring NO production as an indicator of inflammation using macrophage-like RAW 264.7 cells, and demonstrated that differences were linked to observed structural variations. Specific hydrolysis of D-alanyl ester bonds of LTAs was used to determine the involvement of D-alanine in the immunomodulatory potential of LTAs.

Materials and methods

Bacterial strains and growth conditions

B. cereus CH (Anyang Yuanshou[®]), *B. subtilis* CU1 (Probis[®]) and *B. clausii* O/C (Enterogermina[®]) commercial probiotic strains were cultured in 2 L Erlenmeyer flasks at 37 °C in 400 mL Mueller–Hinton broth (Biokar Diagnostics, France) with shaking at 150 rpm.

Extraction of LTA and hydrolysis of D-alanine esters

LTA extraction was adapted from Morath et al. (2001). Bacterial cells were grown to end log phase, in 400 mL cultures, and then harvested by centrifugation at 4,000×g for 15 min at 4 °C. Cells were washed three times with 0.1 M Tris–HCl buffer, pH 8 (Eurobio, France), then resuspended in 20 mL 0.1 M acetate buffer, pH 4.7 (Fisher Scientific, UK). The cells were mixed with an equal volume of *n*-butanol and incubated for 30 min at 37 °C under agitation at 300 rpm. After centrifugation at 13,000×g for 15 min at 4 °C, the aqueous phase was collected, and the bacterial pellet was resuspended again in 20 mL 0.1 M ammonium acetate buffer/pH 4.7 and disrupted by sonication to increase the amount of LTA (80 W, 2 min, Vibracell VC 750 Ultrasonic Processor, Hiel-scher, Germany). Following sonication, the cell suspension was stirred with an equal volume of *n*-butanol for 30 min at 37 °C with shaking at 300 rpm. After phase separation by centrifugation as described previously, the aqueous phases were pooled and lyophilized (VirTis, SP Scientific, USA).

In order to specifically hydrolyze the D-alanyl ester from the different *Bacillus* LTAs, a fraction of each extract was adjusted to pH 8.5 with NH₃ and incubated overnight at 37 °C, as described previously (Morath et al. 2001). The dealanylation was monitored by ¹H NMR.

Purification of LTA

LTA purification was performed as described previously (Ryu et al. 2009). Briefly, dialysate was equilibrated with 0.1 M ammonium acetate buffer containing 15 % *n*-propanol (pH 4.7), then filtered and subjected to hydrophobic-interaction chromatography on an octyl-Sepharose HiPrep column (100 × 16 mm, GE Healthcare, U.K.). The mobile phase, composed of 15 % *n*-propanol in 0.1 M ammonium acetate buffer (pH 4.7), equilibrated the column and eluted unbound materials. LTA were eluted by a linear gradient of *n*-propanol from 15 % to 35 % *n*-propanol in 0.1 M ammonium acetate buffer (pH 4.7) at 2 mL/min. Collected fractions were analyzed on the basis of their phosphorus concentration as described below.

The LTA-containing fractions were subjected to DEAE-Sepharose anion-exchange chromatography

(Fast Flow, GE with Healthcare, 100 × 10 mm column, Waters, USA) equilibrated in 20 mM ammonium acetate buffer (pH 4.7) with 30 % *n*-propanol. LTA was eluted using a 0 to 1 M sodium chloride linear gradient at 2 mL/min. Fractions collected containing LTA were pooled extensively and dialyzed against 500 volumes of 5 mM sodium acetate buffer (pH 4.7) using regenerated cellulose tubular membranes (molecular weight cut off: 3,500, Membrane Filtration Products, USA).

Determination of phosphorus content

Phosphorus concentration was measured as described previously (Chen et al. 1956). For each fraction, 10 µL were mixed with 30 µL 10 % magnesium nitrate (w/v) in absolute ethanol, and were mineralized by flaming. The residue was dissolved with 0.3 mL 0.5 M HCl, then heated for 15 min at 100 °C. After cooling, 0.7 mL 0.42 % ammonium molybdate (v/v) in H₂SO₄:10 % ascorbic acid (w/v) 6:1 was added and the mixture was incubated at 37 °C for 1 h. Absorbance was determined with an appropriated standard at 820 nm (Libra S12, Biochrom, UK). The standard curve was performed using Na₂HPO₄.

¹H NMR

NMR experiments were performed on an AVANCE III 400 Bruker spectrometer operating at a ¹H frequency of 400.13 MHz. A double resonance ¹H/X BBF0 5 mm probe was used. The acquisition pulse sequence used was a 90° pulse sequence with water presaturation and 10 s recycle time. Typically, the accumulation of 2,048 scans was used. Spectra were referenced using the 3-(trimethylsilyl) 3, 3, 2, 2-tetraduteropropionic acid Na salt (d4-TSPA, Sigma-Aldrich, USA) signal at 0 ppm. FID signals were processed using Topspin 2.1[®] software. A line broadening of 0.3 Hz was applied. Peakfit[®] software was used for spectral deconvolution to access chemical shift, coupling constants and peak areas.

LTA structural elucidation

Using chemical shifts previously assigned (Jang et al. 2011; Morath et al. 2001), data described in Table 1 were used for LTA structure elucidation. The average chain length of the poly (glycerol-phosphate)

Table 1 ¹H NMR chemical shift and coupling constant of *Bacillus* species lipoteichoic acid (LTA)

		δ (ppm)	³ J (Hz)
Fatty acids (FA)	–CH ₂ (α)	2.35	–
	–CH ₂ (γ-ω)	1.30	–
	–CH ₃	0.88	–
Alanine (Ala)	Free H _α	3.79	7.2
	Free H _β	1.48	7.2
	Substituted H _α	4.30	7.2
	Substituted H _β	1.64	7.2
Glycerol	Total amount	[3.8–4.2]	–
α-D-N-acetyl-glucosamine (GN)	GN-H ₄	3.49	9.5
	GN-Ac	2.10	–

backbone and degree of D-alanine and N-acetylglucosamine substitutions were quantified from the results of Peakfit[®] software deconvolution of LTA. The total amount of glycerol was determined from the area of the region between 3.8 and 4.2 ppm. The area ratio of glycerol and α-methylene group of the membrane anchor between 2.2 and 2.5 ppm identified the different average chain length. The area ratio of substitute alanine and total amount of glycerol gave the proportion of glycerol esterified by alanine. The area ratio of α-D-N-acetyl-glucosamine H₄ (δ = 3.49 ppm) and total amount of glycerol gave the proportion of glycerol substituted by α-D-N-acetyl-glucosamine. The peak at 2.1 ppm assigned in the literature to N-acetyl wasn't used for calculation because of the presence of superposed peaks at this chemical shift.

Determination of fatty acid by GC–MS

Fatty acid composition was determined as described previously (Lepage and Roy 1986). Purified LTA (about 100 µg) was dried under vacuum with 10 µL of 10 mg/mL C17:0 used as an internal standard. The residue was dissolved in methanol/benzene/acetyl chloride 4:1:0.5 (v/v/v). After incubation at 100 °C for 1 h then cooling, 2.5 mL of 6 % K₂CO₃ (w/v) was added to the mixture. Tubes were centrifuged at 2,000 rpm for 5 min then 1 µL of supernatant loaded on the GC–MS system (gas chromatograph GC8060, mass spectrometer MD800, Fison Instrument, Italy). A capillary column INNOWAX (30 m × 0.25 mm i.d.) coated with 0.15 µm polyethyleneglycol film (Agilent

J&W Scientific, USA) was used for separation and maintained at 180 °C in the oven. The supernatant was injected at 250 °C and eluted by high purity helium as carrier gas, with a 2 mL/min split mode flow rate (1:20).

RAW 264.7 cells

The mouse macrophage cell line RAW 264.7 was obtained from the ATCC (TIB-71TM) and was cultured in Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI, Gibco, USA) supplemented with 10 % heat inactivated fetal bovine serum (FBS, Gibco, USA), 2 mM glutamine (Gibco, USA), 1 % non-essential amino-acids, 1 % vitamins, 100 IU/mL penicillin (Gibco, USA), 100 µg/mL streptomycin (Gibco, USA) and 1 mM sodium pyruvate (Gibco, USA). The cells were cultured in a humid atmosphere, at 37 °C and 5 % CO₂.

NO production

Nitrite accumulation in the culture medium was considered to be an indication of NO production as described previously (Green et al. 1982). RAW 264.7 cells were seeded in 96-well plates at 1×10^4 cells per well overnight. Cells were stimulated for 48 h with LTA from probiotic *Bacillus* strains at three concentrations (0.1, 1 and 10 µg/mL). 0.8 mL of Griess reagent (0.5 % sulfanilic acid, 1.4 % acetic acid, and 0.008 % naphthylethylenediamine) was mixed with culture supernatants. The optical density was determined at 535 nm (Libra S12, Biochrom, UK) by comparison with a NaNO₂ standard curve. A negative control with 5 mM sodium acetate buffer (pH 4.7) and two positive controls with commercial LPS from *Escherichia coli* K12 (InvivoGen, France) and commercial LTA from *S. aureus* (InvivoGen) were used.

LTA cytotoxicity was assessed by adding 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide solution (MTT, Sigma-Aldrich, USA) at a final concentration of 0.5 mg/mL in each well for 3 h at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5 % CO₂. Afterwards, supernatants were removed and formazan crystals were dissolved with 200 µL DMSO. Absorbance was measured with a microplate spectrophotometer at 595 nm (TRIAD series Multimode Detector, Dynex, USA) and compared to controls (data not shown).

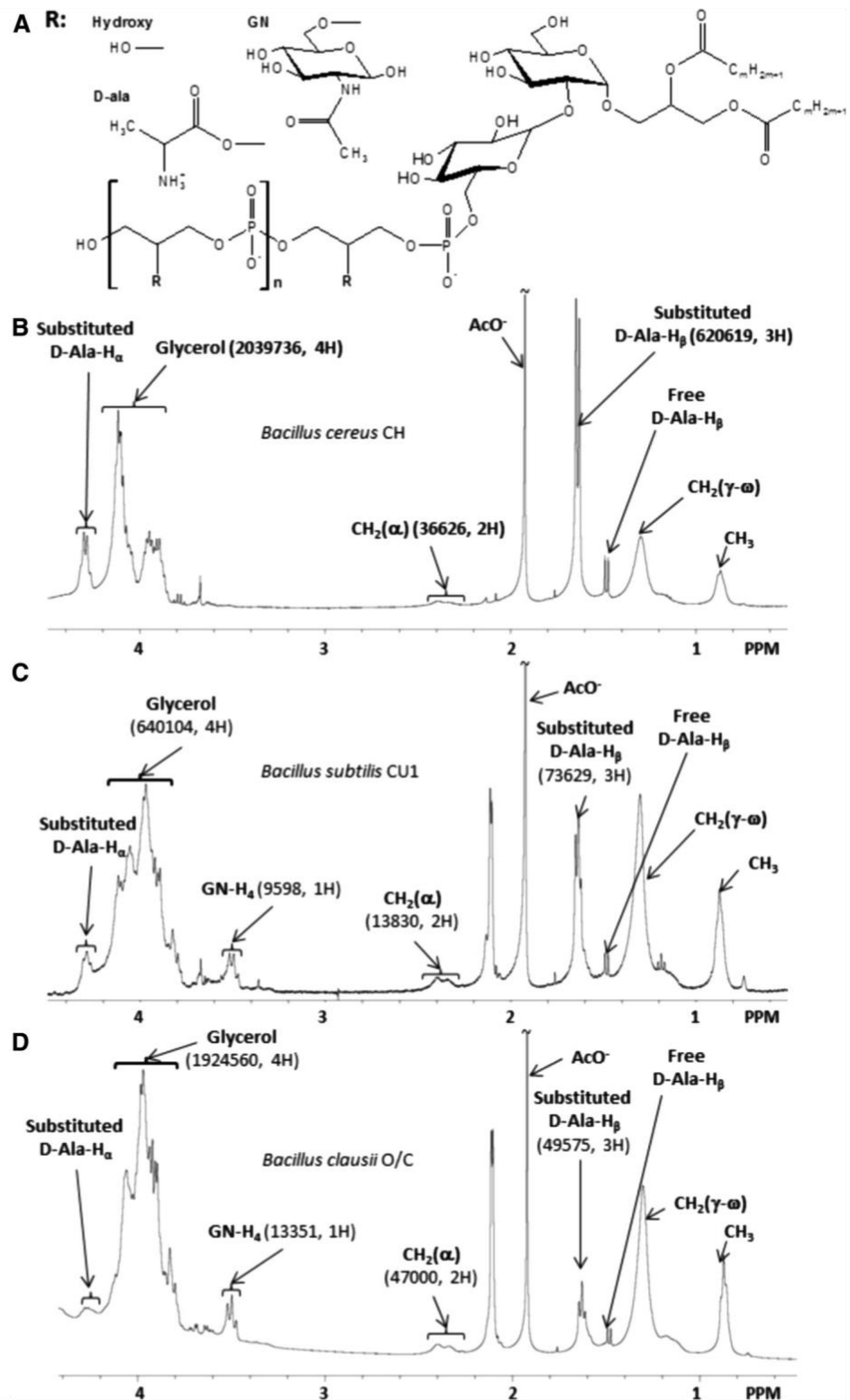
Results & discussion

¹H NMR and GC–MS analyses reveal structural variations between three *Bacillus* LTAs

In order to compare the structure of LTAs from three different *Bacillus* strains, they were extracted using the *n*-butanol method (Morath et al. 2001) and purified by hydrophobic-interaction chromatography followed by ion-exchange chromatography (Ryu et al. 2009). Chemical structures were assessed for each LTA using ¹H NMR spectroscopy and results are shown in Fig. 1. ¹H NMR spectra of LTAs obtained in previous studies (Jang et al. 2011; Morath et al. 2001; Wörmann et al. 2011) were used as references to assign the chemical shifts in our analysis (Table 1) and quantification is summarized in Table 2. Results presented in Fig. 1 and Tables 1, 2 and 3 are based on a single LTA isolation. LTA structural characterizations were also done on other preparations and showed comparable results (data not shown).

The ¹H NMR spectra (Fig. 1) showed characteristic signals for glycerol between 3.8 ppm and 4.2 ppm, which were used to determine the number of (glycerol-phosphate) repeating units of each LTA molecule. Signal at $\delta = 3.45$ ppm was used for determination of *N*-acetylglucosamine substitutions and *D*-alanine substitutions were quantified from signals at $\delta = 1.64$ ppm and $\delta = 4.30$ ppm (Table 1). The ¹H NMR spectrum of *B. cereus* LTA indicated the longest poly (glycerol-phosphate) chain length with an average of 28 U, and the highest degree of *D*-alanine substitutions (41 %) without glucosamine. Analysis of *B. subtilis* LTAs showed an average poly (glycerol-phosphate) chain length of 23 U, substituted with about 17 % *D*-alanine and 7 % *N*-acetylglucosamine. The hydrophilic backbone of *B. clausii* LTA, with a polymerization degree of 20, is substituted with 3 % *N*-acetylglucosamine and only 3 % *D*-alanine (Table 2). The results obtained for the poly (glycerol-phosphate) chain length are in agreement with a previous study on *Bacillus* LTAs (Iwasaki et al. 1989), who calculated the number of repeating units in the poly (glycerol-phosphate) chain of LTAs from several *Bacillus* strains to be 25–35. However, this determination was not investigated using spectroscopic analysis, and preparation of LTAs was done with the hot phenol extraction method. A previous NMR study on a commercial *B. subtilis* LTA (from *B. subtilis* DSMZ

Fig. 1 (a) General model of the molecular structure of *Bacillus* LTAs as determined from ^1H NMR analysis. n represents the number of glycerol-phosphate repeating units of the hydrophilic backbone, and R the substituent group of glycerol. R can be hydroxyl groups (Hydroxy), D-alanine (D-Ala) or *N*-acetylglucosamine (GN). (b) ^1H NMR spectrum of *B. cereus* CH LTA. (c) ^1H NMR spectrum of *B. subtilis* CU1 LTA. (d) ^1H NMR spectrum of *B. clausii* O/C LTA. Areas (in a.u.) and the corresponding number of hydrogen used for chain length, proportion of glycerol esterified with alanine and proportion of glycerol substituted with *N*-acetylglucosamine calculations, are indicated in bracket



1087) showed LTA with a short hydrophilic backbone (22 repeating units of glycerol-phosphate in average) (Morath et al. 2002a). In our study, despite differences

in chemical composition of LTA depending on the strain, our observations seem to confirm the presence of a relatively short poly (glycerol-phosphate)

Table 2 Structure of native LTA prepared from *Bacillus* strains determined by ¹H NMR spectroscopy (see paragraph 3.7)

	<i>B.cereus</i> CH	<i>B.subtilis</i> CU1	<i>B.clausii</i> O/C
Glycerol-phosphate chain length (n)	28	23	20
D-alanine (D-Ala) substitution rate	41 %	17 %	3 %
N-acetylglucosamine (GN) substitution rate	0 %	7 %	3 %
Estimated molecular weight (Da)	5,800	4,900	4,000

Table 3 Fatty acid composition of LTA, expressed in percentage of total fatty acids

Fatty acid	Percentage of total fatty acids		
	<i>B.cereus</i> CH	<i>B.subtilis</i> CU1	<i>B.clausii</i> O/C
C14:0	13	0	2.3
Iso- and Anteiso-C15:0	51	59.8	58.5
C16:0	10.3	9.4	9.5
Iso- and Anteiso-C16:0	11.4	8	9
C16:1	0	0	0
Iso-C17:0	9.1	8.5	8.1
Anteiso-C17:0	5.2	14.3	12.6
C18:0	0	0	0
C18:1	0	0	0

backbone in LTA from several *Bacillus* species. However, (Morath et al. 2002a, b) found a substitution rate of 25 % with D-alanine and N-acetylglucosamine, which is quite different from that of our *B. subtilis* strain. This observation shows that the chemical composition of LTAs may vary within the same species. D-alanine substitution is the most variable part in the LTA structure of the three studied *Bacillus* strains, with a substitution rate of 17 % in *B. subtilis* LTA, 3 % in *B. clausii* LTA and 41 % in *B. cereus* LTA. These major differences could lead to different biological activities of the LTAs. Our results show a reverse distribution of D-alanine substituent compared to a previous study on *Enterococcus faecalis* (Kiel 27738) LTAs extracted using the hot-phenol method

(Leopold and Fischer 1992). We observed that as the chain length increases, the D-alanine substitution rate increased as well. Chemical characterization of LTA from the pathogen *S. aureus* (strain DSM 20233) revealed a degree of polymerization ranging between 45 and 50, with a high substitution rate for D-alanine (70 %) and only 15 % N-acetylglucosamine (Morath et al. 2005). Compositional differences between *S. aureus* LTA and the described *Bacillus* LTAs of this study highlight significant variability in composition between LTAs from members of two distinct genera, and moreover between pathogenic and probiotic bacteria. Presumably these structural differences could be involved in recognition by eukaryotic cells to distinguish between pathogenic and non-pathogenic bacteria. N-acetylglucosamine substitutions in LTAs of the three *Bacillus* appeared less numerous than D-alanine substitutions. *B. cereus* LTA showed no substitution of hydrophilic chains with glucosamine, while we found only 3 % N-acetylglucosamine substitutions in poly (glycerol-phosphate) chains of *B. clausii* LTA and 7 % in *B. subtilis* LTA (Table 2). β-GlcNac-P-polyprenol synthetase or the enzyme catalyzing N-acetylglucosamine transfer from β-GlcNac-polyprenol to LTA could be responsible for the N-acetylglucosamine branches on poly (glycerol-phosphate) chains. However, the role of N-acetylglucosamine is not well understood because of the lack of studies and greater attention given to D-alanine. Moreover, estimation of the molecular weight of *Bacillus* LTAs using ¹H NMR demonstrated their small size (4,000–5,800 Da), compared with those of *S. aureus* or *L. plantarum*, reflecting their shorter hydrophilic backbones (Table 2).

Regarding the lipid anchor of LTA, very few authors have analyzed the nature of fatty acids (Morath et al. 2001; Roethlisberger et al. 2000; Shiraishi et al. 2013). Previous structural characterizations of LTAs were done using NMR spectroscopy, but this way does not allow the determination of the nature of the acyl chains because of the microheterogeneity in the fatty acid composition. In order to describe the lipid anchor nature and determine more precisely the length of fatty acids, we performed a GC-MS analysis as described in Methods. Results are expressed as a percentage of each specified fatty acid to total fatty acids presented in purified LTAs (Table 3). LTA exhibited similar composition in fatty acids between the different *Bacillus* strains. These

results showed the presence of branched fatty acids, mainly iso- and anteiso-C15:0, and in lesser amounts C14:0, C16:0, iso- and anteiso-C16:0, and iso- and anteiso-C17:0, which is in agreement with previous study on LTA from other *Bacillus* strains (Iwasaki et al. 1989). These branched fatty acids have been previously identified in the membranes of some bacterial genera including *Bacillus* (Li et al. 2010). However, the content of each fatty acid differed significantly between *Bacillus* strains, especially in *B. cereus* with lower amounts of anteiso-C17:0 and higher amounts of C14:0. Given the possible role of the lipid anchor in the LTA recognition by cell receptors (Jin et al. 2007), these structural variations could be partly responsible for differences in LTA biological activity but this needs to be investigated further.

Levels of nitric oxide production by RAW 264.7 cells induced by LTAs is strain dependent

Among the beneficial effects of probiotic bacteria, their ability to modulate intestinal immune responses could be mediated by LTAs in Gram-positive organisms. Generation of NO is a key feature of many immune cells, including dendritic cells, NK cells, mast cells, and macrophages which recognize the molecular patterns associated with pathogens, e.g. LPS or LTA, via their PRR. NO has been shown to have diverse biological functions and considered as one of the most versatile players in the immune system. NO can induce an anti-inflammatory effect under normal and physiological conditions. However, NO is considered as a pro-inflammatory mediator that induces inflammation due to overproduction in abnormal situations. We investigated the potential of LTA from probiotic *Bacillus* strains to induce the immune defense mechanisms by testing their ability to enhance production of NO (Kang et al. 2011). RAW 264.7 cells were incubated with each highly purified LTA at three different concentrations (0.1, 1 and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 48 h. The purity of each LTA was controlled by determination of amino acid composition (Bidlingmeyer et al. 1984) using the Pico-Tag Method (Waters, USA). No amino acids except D-alanine were present in the samples which confirmed the absence of contaminating lipoproteins (data not shown). Nitrite accumulation was determined as an indicator of NO production. Cell viability after treatment was

monitored by MTT assay and showed no cytotoxicity (data not shown). Highly purified commercial LPS from *E. coli* K12 and LTA from *S. aureus* at the same concentrations were used as positive controls. To establish a rigorous correlation between structure and activity, biological assays were performed with the preparations previously characterized by ^1H NMR and GC-MS. As shown in Fig. 2, NO production in the presence of *Bacillus* LTA or *S. aureus* LTA at 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was similar to the negative control. However, at the same concentration, LPS was a stronger inducer of NO production. At 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, LPS induced NO production was almost two times greater than the negative control, and nearly three times higher at 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. These results are consistent with a previous report showing that LPS is more immunostimulatory than LTA for macrophages (Kimbrell et al. 2008). *S. aureus* LTA and each *Bacillus* LTA produced two fold more NO at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ than at lower concentrations, which led us to conclude that the NO-enhancing effects became significant at concentrations above 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LTA compared to the control. NO production observed with LTAs from *B. subtilis*, *B. clausii*, and *B. cereus* was significantly lower than that obtained with *S. aureus* LTA, although *B. subtilis* and *B. clausii* LTAs revealed their ability to induce high NO production. *B. cereus* LTA had lower inflammatory effects at the same concentration. We could hypothesize that these differences in the immunomodulatory properties of each LTA depend directly on their structure. Indeed, structural analysis showed that the lipid anchor composition of *B. cereus* LTA is significantly different to that of *B. subtilis* and *B. clausii* LTAs. It has been reported in several studies that the acyl fatty acid chains play a significant role in LTA-mediated immune response from pathogenic and beneficial bacteria, depending on their recognition by receptors (Baron and Kasper 2005; Han et al. 2003; Morath et al. 2002b). Although LTA from *Streptococcus pneumoniae* and *S. aureus* are structurally quite different, they were both previously described as ligands for TLR2. Pneumococcal LTA, the glycolipid anchor of which has unsaturated fatty acids, showed 100-fold less TLR stimulation than staphylococcal LTA consisting of only saturated fatty acids, as reported by Han et al. (2003). Although LTA recognition by TLR2 is actually under debate (Dammermann et al. 2013; Fischer et al. 2011; Ray et al. 2013; Schmidt et al. 2011), it is plausible from our study that

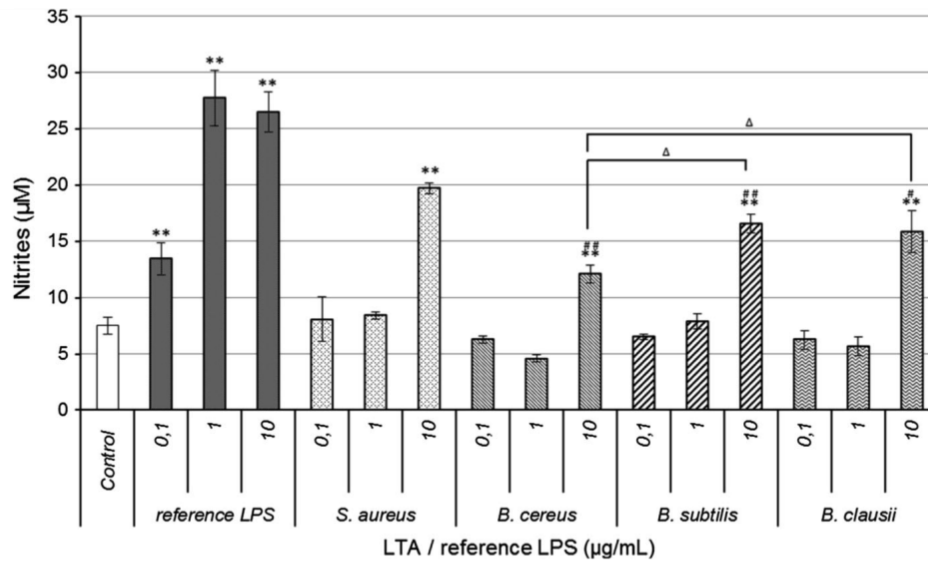


Fig. 2 Probiotics *B. cereus*, *B. subtilis* and *B. clausii* LTA enhance NO production in RAW 264.7 cells, but in lesser amounts than LPS from pathogenic *E. coli* or LTA from *S. aureus*. RAW 264.7 cells (1×10^4 cells per well) were incubated with indicated concentrations of LTA or reference LPS for 48 h, and nitrite production was measured in culture

supernatants. Values are median \pm S.D. of three replicates for each group. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ as compared with the control; $^{\Delta}p < 0.05$ as compared with *B. cereus* LTA at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$ as compared with commercial *S. aureus* LTA at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

the relatively low immunomodulatory effect of *B. cereus* LTA could be partially linked to the nature of the acyl chains. On the other hand, the D-alanine substitution rate of *B. cereus* LTA is the highest from the three studied strains (41 %), while this LTA was the less immunostimulatory. LTAs from *B. subtilis* and *B. clausii*, with a D-alanine substitution rate of 17 % and 3 % respectively, induced higher NO production. These results indicate that there is no proportional correlation between the substitution rate by D-alanine and NO production. Although *S. aureus* LTAs have been described with an approximately 70 % D-alanylation rate and high immunostimulatory potential, results obtained from our structure and activity study of *Bacillus* LTAs did not show that more alanine means higher activity.

Previous studies have shown that LTA from probiotic bacteria which induce NO production, but in less amounts than LPS, seems to have an inflammatory potential (Ryu et al. 2009). LTAs from the three studied strains could have the same properties, but it is not incompatible with a probiotic activity. There are two distinct types of immunomodulatory effects associated with the probiotic consumption, and which depend directly on the patients health (Heyman and Heuvelin 2006). The first is the ability of probiotics to reduce

inflammation in patients with inflammatory bowel diseases, and the second is that probiotics could have an immunostimulatory effect on healthy individuals. This last point suggests that a probiotic, which interacts with intestinal cells, could lead to the secretion of pro-inflammatory compounds such as cytokines or NO. Inflammation induced by pro-inflammatory compounds is a helpful process in activating the host immune system against invading microbes. However, excessive inflammation can cause severe inflammatory diseases. *S. aureus* is a common pathogen involved in such pathologies and its LTA is a potent inducer of inflammation (Ginsburg 2002). LTA from the three *Bacillus* strains are weaker inducer of NO production compared to LPS or *S. aureus* LTA, which suggests that they could stimulate the immune system, but not to the point of leading to a pathologic level of inflammation as caused by LTA from pathogens. This hypothesis, previously proposed for *L. plantarum* (KCTC10887BP) LTA (Kim et al. 2008), is supported by the fact that the *Bacillus* strains studied here are described as beneficial immune stimulators.

Our results raise the question of the involvement of D-alanine in the biological activity of LTAs. To investigate the key role of D-alanine in the immunological activity of LTAs, each of them were

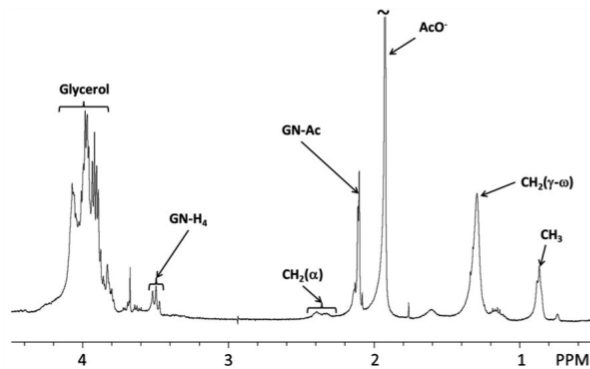


Fig. 3 Efficiency of LTA chemical dealanylation controlled by ^1H NMR analysis (example shown for *B. subtilis* CU1 LTA). D-alanine ester specific hydrolysis was assessed at pH 8.5 during 24 h (Morath et al. 2001)

specifically dealanylated and their NO induction potential was assessed.

Dealanylation of *Bacillus* LTAs abrogates their ability to induce NO production by RAW 264.7 cells

We next examined the effect of dealanylation on LTA immunological activity. Specific treatment of D-alanine ester could lead to the removal of all ester-bound substituents (Gisch et al. 2013). Previous structure/function relationship studies using partially degraded LTA tried to highlight structural features involved in LTA biological activity. However, these chemical modifications of LTA structure were not always specific and needed spectroscopic characterization to confirm the efficiency and specificity of the degradations before determining the biological activity. Here, each *Bacillus* LTA was treated at pH 8.5 for 24 h as described previously (Morath et al. 2001), resulting in hydrolysis of D-alanine esters. Efficiency and specificity of dealanylation was monitored by ^1H NMR, with the loss of signals at $\delta = 1.64$ ppm and $\delta = 4.30$ ppm only. *B. subtilis* LTA dealanylation is shown as an example in Fig. 3 (results presented in Fig. 3 are based on a single LTA isolation). RAW 264.7 cells were incubated with dealanylated LTAs at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 48 h, followed by analysis of NO production (Fig. 4). Dealanylation completely abrogated the immunostimulatory potential of LTAs regardless of the *Bacillus* strain. Despite the controversial role of D-alanine observed in previous studies (Cot et al. 2011), our findings demonstrate that a baseline level of D-alanine substitution is fundamental to the biological activity of

LTA, but that superfluous substitution is not directly proportional to immunological activity. Several hypotheses have to be considered regarding the potential role of D-alanine. Indeed, at a pH near seven, the D-alanine primary amino groups and phosphates of hydrophilic backbones are respectively cationic and anionic. A previous ^{31}P NMR analysis of *Lactobacillus fermentum* NCTC 6375 LTA showed that phosphorus had two additional peaks in addition to the primary resonance which seemed to originate from differences in ion pairing between the amino function of D-alanyl residues and the two adjacent anionic phosphodiester anionic linkages (Batley et al. 1987; Neuhaus and Baddiley 2003). Neuhaus and Baddiley (2003) proposed two energy-minimized models, one in which the protonated amino group forms ion pairs with the upchain phosphodiester and in the one other with the down-chain phosphodiester. These intramolecular interactions lead to a decreased net anionic charge of LTA, and therefore an enhanced hydrophobic effect which could cause intramolecular folding. However, as observed previously (Garimella et al. 2009), this model disagrees with experimental data which show that the presence of D-alanine in the cell wall of Gram-positive bacteria provides resistance to cationic antimicrobial peptides through charge repulsion mechanisms (Peschel 2002). However, we hypothesize that ionic bonds created between certain D-alanines and non-adjacent phosphates, could lead to other three dimensional conformations. These two potential refoldings may limit intermolecular interactions of LTAs and could radically change their biological activity. It is important to consider the fact that various spatial conformations are not recognized in the same way by receptors and could lead to different biological responses by cells. Indeed, these differences in chemical composition of LTAs could modify their ability to interact with receptor binding sites. An earlier study on the interaction between LTA and the Macrophage Scavenger Receptor reported that a partial compensation for the negative charges of the hydrophilic chain with D-alanine decreased affinity for the receptor (Greenberg et al. 1996). A higher density of negative charges on LTAs probably plays an important role in affinity for PRR, but our study suggests that this is not what is causing their biological activity. Moreover, Nilsen et al. (2008) have demonstrated, in the case of TLR2 recognition, that blocking CD36 or CD14 inhibits binding of purified LTA to monocytes, which confirms the key role of co-receptors in the biological activity of LTA. From the results, we could suppose that the LTA

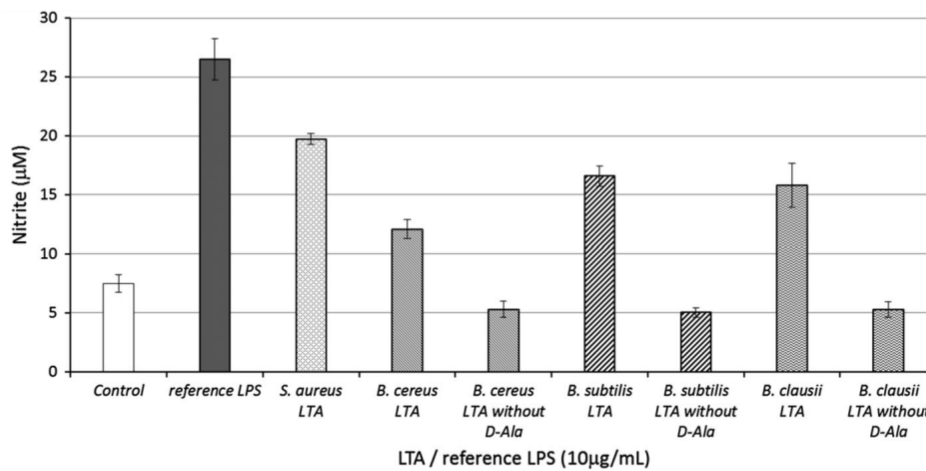


Fig. 4 Hydrolysis of LTA D-alanine esters leads to LTA inactivation in NO production. D-alanine esters were hydrolyzed at pH 8.5 for 24 h. RAW 264.7 cells (1×10^4 cells per well) were stimulated with 10 µg/mL *Bacillus* LTA, reference *S.*

aureus LTA or reference LPS for 48 h. Nitrite production was measured as described previously (Green et al. 1982). Values are median ± S.D. of three replicates for each group

lipid anchor is probably recognized by TLR2, but the hydrophilic chain could be involved in heterodimerization with TLR6 and/or recruitment of co-receptors. These observations are valid in the case of isolated molecules. However, we suppose that in solution, multimerization between two or more LTA molecules is possible. In the same manner as described previously, protonated amino groups of the LTA hydrophilic backbone could form ion pairs with the phosphodiester of other LTA molecules, leading to aggregation of hydrophilic chains and possibly to micellar arrangements (Fischer et al. 1997; Wicken et al. 1986). We can suppose that LTA dimerization may enhance their biological activity. It is also possible that hydrophilic chains of LTAs interact by hydrophobic effects in the case of intramolecular ion pairing, leading to other possibilities for intermolecular interactions. For these reasons, the spatial conformation of LTA must be studied as well as interactions between LTA and PRR. Molecular arrangements could be studied by dynamic molecular calculations. Different substitution rates of D-alanine and multimerisation of monomers must be considered to determine a model of hypothetical interactions.

Conclusion

This study is the first which compared the structure and biological activity of LTA from probiotic strains of

members of the genus *Bacillus*. The three studied *Bacillus* LTAs showed chemical composition differences, regarding both poly (glycerol-phosphate) chain length and the substitution rate with D-alanine and N-acetylglucosamine. Despite major differences in their structures, *B. subtilis* and *B. clausii* LTAs showed nearly the same ability to induce NO production by RAW 264.7, while *B. cereus* LTA seems to induce less by comparison. A key role for D-alanine in the macrophage stimulation activity of *Bacillus* LTA has been shown here. Using a strategy to modify a structural component of the bacterial cell envelope, we have contributed to the understanding of their potential role in immunomodulatory activity of probiotic *Bacillus* strains.

Acknowledgments This work was supported by a research grant from the Conseil Régional du Limousin. We are very grateful to Jeanne Cook-Moreau for English rereading.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License which permits any use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and the source are credited.

References

Baik JE, Jang KS, Kang SS, Yun CH, Lee K, Kim BG, Kum KY, Han SH (2011) Calcium hydroxide inactivates lipoteichoic acid from *Enterococcus faecalis* through deacylation of the

- lipid moiety. *J Endotoxin Res* 37:191–196. doi:[10.1016/j.joen.2010.11.007](https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.11.007)
- Baron MJ, Kasper DL (2005) Anchors away: contribution of a glycolipid anchor to bacterial invasion of host cells. *J Clin Invest* 115:2325–2327. doi:[10.1172/JCI26285](https://doi.org/10.1172/JCI26285)
- Batley M, Redmond JW, Wicken AJ (1987) Nuclear magnetic resonance spectra of lipoteichoic acid. *Biochim Biophys Acta* 901:127–137
- Bidlingmeyer BA, Cohen SA, Tarvin TL (1984) Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. *J Chromatogr* 336:93–104. doi:[10.1016/S0378-4347\(00\)85133-6](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)85133-6)
- Blanc L, Castanier R, Mishra AK, Ray A, Besra GS, Sutcliffe I, Vercellone A, Nigou J (2013) Gram-Positive Bacterial Lipoglycans Based on a Glycosylated Diacylglycerol Lipid Anchor Are Microbe-Associated Molecular Patterns Recognized by TLR2. *PLoS ONE* 8:e81593. doi:[10.1371/journal.pone.0081593](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081593)
- Casula G, Cutting SM (2002) *Bacillus* probiotics: spore germination in the gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* 68:2344–2352. doi:[10.1128/AEM.68.5.2344-2352.2002](https://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2344-2352.2002)
- Chan KG, Mayer M, Davis EM, Halperin SA, Lin T-J, Lee SF (2007) Role of D-alanylation of *Streptococcus gordonii* lipoteichoic acid in innate and adaptive immunity. *Infect Immun* 75:3033–3042. doi:[10.1128/IAI.01549-06](https://doi.org/10.1128/IAI.01549-06)
- Chen P Jr, Toribara TT, Warner H (1956) Microdetermination of phosphorus. *Anal Chem* 28:1756–1758. doi:[10.1021/ac60119a033](https://doi.org/10.1021/ac60119a033)
- Cot M, Ray A, Gilleron M, Vercellone A, Larrouy-Maumus G, Armau E, Gauthier S, Tiraby G, Puzo G, Nigou Jm (2011) Lipoteichoic acid in *Streptomyces hygroscopicus*: structural model and immunomodulatory activities. *PLoS ONE* 6:e26316. doi:[10.1371/journal.pone.0026316](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026316)
- Cutting SM (2011) *Bacillus* probiotics. *Food Microbiol* 28:214–220. doi:[10.1016/j.fm.2010.03.007](https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.007)
- Dammermann W, Wollenberg L, Bentzien F, Lohse A, Luth S (2013) Toll like receptor 2 agonists lipoteichoic acid and peptidoglycan are able to enhance antigen specific IF- γ release in whole blood during recall antigen responses. *J Immunol Methods* 396:107–115. doi:[10.1016/j.jim.2013.08.004](https://doi.org/10.1016/j.jim.2013.08.004)
- Deininger S, Stadelmaier A, von Aulock S, Morath S, Schmidt RR, Hartung T (2003) Definition of structural prerequisites for lipoteichoic acid-inducible cytokine induction by synthetic derivatives. *J Immunol* 170:4134–4138. doi:[10.4049/jimmunol.170.8.4134](https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.8.4134)
- Deininger S, Traub S, Aichele D, Rupp T, Baris T, Möller HM, Hartung T, von Aulock S (2008) Presentation of lipoteichoic acid potentiates its inflammatory activity. *Immunobiology* 213:519–529. doi:[10.1016/j.imbio.2008.01.001](https://doi.org/10.1016/j.imbio.2008.01.001)
- Duc LH, Hong HA, Cutting SM (2003) Germination of the spore in the gastrointestinal tract provides a novel route for heterologous antigen delivery. *Vaccine* 21:4215–4224. doi:[10.1016/S0264-410X\(03\)00492-4](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(03)00492-4)
- Fischer W, Markwitz S, Labischinski H (1997) Small Angle X Ray Scattering Analysis of Pneumococcal Lipoteichoic Acid Phase Structure. *Eur J Biochem* 244:913–917. doi:[10.1111/j.1432-1033.1997.00913.x](https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00913.x)
- Fischer K, Stein K, Ulmer AJ, Lindner B, Heine H, Holst O (2011) Cytokine-inducing lipoteichoic acids of the allergy-protective bacterium *Lactococcus lactis* G121 do not activate via Toll-like receptor 2. *Glycobiology* 21:1588–1595. doi:[10.1093/glycob/cwr071](https://doi.org/10.1093/glycob/cwr071)
- Fittipaldi N, Sekizaki T, Takamatsu D, Harel J, de la Cruz Domínguez-Punaro M, Von Aulock S, Draing C, Marois C, Kobisch M, Gottschalk M (2008) D-alanylation of lipoteichoic acid contributes to the virulence of *Streptococcus suis*. *Infect Immun* 76:3587–3594. doi:[10.1128/IAI.01568-07](https://doi.org/10.1128/IAI.01568-07)
- Garimella R, Halye JL, Harrison W, Klebba PE, Rice CV (2009) Conformation of the phosphate D-alanine zwitterion in bacterial teichoic acid from nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* 48:9242–9249. doi:[10.1021/bi900503k](https://doi.org/10.1021/bi900503k)
- Ginsburg I (2002) Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation. *Lancet Infect Dis* 2:171–179. doi:[10.1016/S1473-3099\(02\)00226-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(02)00226-8)
- Gisch N, Kohler T, Ulmer AJ, Müthing J, Pribyl T, Fischer K, Lindner B, Hammerschmidt S, Zähringer U (2013) Structural reevaluation of *Streptococcus pneumoniae* Lipoteichoic acid and new insights into its immunostimulatory potency. *J Biol Chem* 288:15654–15667. doi:[10.1074/jbc.M112.446963](https://doi.org/10.1074/jbc.M112.446963)
- Grangette C, Nutten S, Palumbo E, Morath S, Hermann C, Dewulf J, Pot B, Hartung T, Hols P, Mercenier A (2005) Enhanced antiinflammatory capacity of a *Lactobacillus plantarum* mutant synthesizing modified teichoic acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:10321–10326. doi:[10.1073/pnas.0504084102](https://doi.org/10.1073/pnas.0504084102)
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [^{15}N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126:131–138. doi:[10.1016/0003-2697\(82\)90118-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90118-X)
- Greenberg J, Fischer W, Joiner K (1996) Influence of lipoteichoic acid structure on recognition by the macrophage scavenger receptor. *Infect Immun* 64:3318–3325
- Han SH, Kim JH, Martin M, Michalek SM, Nahm MH (2003) Pneumococcal lipoteichoic acid (LTA) is not as potent as *staphylococcal* LTA in stimulating Toll-like receptor 2. *Infect Immun* 71:5541–5548. doi:[10.1128/IAI.71.10.5541-5548.2003](https://doi.org/10.1128/IAI.71.10.5541-5548.2003)
- Heyman M, Heuvelin E (2006) Probiotic micro-organisms and immune regulation: the paradox. Paper presented at the Métabolisme Nce (ed) VIe Symposium nutrition « Intervention nutritionnelle : de la prévention à la thérapeutique », Brest, France, 2005. doi:[10.1016/j.nupar.2006.04.003](https://doi.org/10.1016/j.nupar.2006.04.003)
- Hong HA, Duc LH, Cutting SM (2005) The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiol Rev* 29:813–835. doi:[10.1016/j.femsre.2004.12.001](https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.12.001)
- Hong SW, Baik JE, Kang SS, Yun CH, Seo DG, Han SH (2014) Lipoteichoic acid of *Streptococcus mutans* interacts with Toll-like receptor 2 through the lipid moiety for induction of inflammatory mediators in murine macrophages. *Mol Immunol* 57:284–291. doi:[10.1016/j.molimm.2013.10.004](https://doi.org/10.1016/j.molimm.2013.10.004)
- Hsiao G, Huang H-Y, Fong T-H, Shen M-Y, Lin C-H, Teng C-M, Sheu J-R (2004) Inhibitory mechanisms of YC-1 and PMC in the induction of iNOS expression by lipoteichoic acid in RAW 264.7 macrophages. *Biochem Pharmacol* 67:1411–1419. doi:[10.1016/j.bcp.2003.12.010](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2003.12.010)
- Iwasaki H, Shimada A, Yokoyama K, Ito E (1989) Structure and glycosylation of lipoteichoic acids in *Bacillus* strains. *J Bacteriol* 171:424–429

- Jang K-S, Baik JE, Han SH, Chung DK, Kim B-G (2011) Multi-spectrometric analyses of lipoteichoic acids isolated from *Lactobacillus plantarum*. *Biochem Biophys Res Commun* 407:823–830. doi:10.1016/j.bbrc.2011.03.107
- Jensen GS, Benson KF, Carter SG, Endres JR (2010) GanedenBC30™ cell wall and metabolites: anti-inflammatory and immune modulating effects in vitro. *BMC Immunol* 11:15. doi:10.1186/1471-2172-11-15
- Jin MS, Kim SE, Heo JY, Lee ME, Kim HM, Paik S-G, Lee H, Lee J-O (2007) Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell* 130:1071–1082. doi:10.1016/j.cell.2007.09.008
- Kang JY, Nan X, Jin MS, Youn S-J, Ryu YH, Mah S, Han SH, Lee H, Paik S-G, Lee J-O (2009) Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 heterodimer. *Immunity* 31:873–884. doi:10.1016/j.immuni.2009.09.018
- Kang S-S, Ryu YH, Baik JE, Yun C-H, Lee K, Chung DK, Han SH (2011) Lipoteichoic acid from *Lactobacillus plantarum* induces nitric oxide production in the presence of interferon- γ in murine macrophages. *Mol Immunol* 48:2170–2177. doi:10.1016/j.molimm.2011.07.009
- Kengatharan M, Kimpe SJ, Thiemermann C (1996) Analysis of the signal transduction in the induction of nitric oxide synthase by lipoteichoic acid in macrophages. *Br J Pharmacol* 117:1163–1170. doi:10.1111/j.1476-5381.1996.tb16711.x
- Kim HG, Lee SY, Kim N-R, Ko MY, Lee JM, Yi T-H, Chung SK, Chung DK (2008) Inhibitory effects of *Lactobacillus plantarum* lipoteichoic acid (LTA) on *Staphylococcus aureus* LTA-induced tumor necrosis factor- α production. *J Microbiol Biotechnol* 18:1191–1196
- Kimbrell MR, Warshakoon H, Cromer JR, Malladi S, Hood JD, Balakrishna R, Scholdberg TA, David SA (2008) Comparison of the immunostimulatory and proinflammatory activities of candidate Gram-positive endotoxins, lipoteichoic acid, peptidoglycan, and lipopeptides, in murine and human cells. *Immunol Lett* 118:132–141. doi:10.1016/j.imlet.2008.03.009
- Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SC (2010) Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nat Rev Microbiol* 8:171–184. doi:10.1038/nrmicro2297
- Lebeer S, Claes IJ, Vanderleyden J (2012) Anti-inflammatory potential of probiotics: lipoteichoic acid makes a difference. *Trends Microbiol* 20:5–10. doi:10.1016/j.tim.2011.09.004
- Leopold K, Fischer W (1992) Heterogeneity of lipoteichoic acid detected by anion exchange chromatography. *Arch Microbiol* 157:446–450. doi:10.1007/BF00249103
- Lepage G, Roy CC (1986) Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J Lipid Res* 27:114–120
- Leser T, Knarreborg A, Worm J (2008) Germination and outgrowth of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* spores in the gastrointestinal tract of pigs. *J Appl Microbiol* 104:1025–1033. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03633.x
- Li Y, Wu S, Wang L, Li Y, Shi F, Wang X (2010) Differentiation of bacteria using fatty acid profiles from gas chromatography–tandem mass spectrometry. *J Sci Food Agric* 90:1380–1383. doi:10.1002/jsfa.3931
- Marseglia GL, Tosca M, Cirillo I, Licari A, Leone M, Marseglia A, Castellazzi AM, Ciprandi G (2007) Efficacy of *Bacillus clausii* spores in the prevention of recurrent respiratory infections in children: a pilot study. *Ther Clin Risk Manag* 3:13–17
- Mazza P (1994) The use of *Bacillus subtilis* as an anti-diarrhoeal microorganism. *Boll Chim Farm* 133:3–18
- Mohamadzadeh M, Pfeiler EA, Brown JB, Zadeh M, Gramarossa M, Managlia E, Bere P, Sarraj B, Khan MW, Pakanati KC (2011) Regulation of induced colonic inflammation by *Lactobacillus acidophilus* deficient in lipoteichoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:4623–4630. doi:10.1073/pnas.1005066107
- Morath S, Geyer A, Hartung T (2001) Structure-Function Relationship of Cytokine Induction by Lipoteichoic Acid from *Staphylococcus aureus*. *J Exp Med* 193:393–398. doi:10.1084/jem.193.3.393
- Morath S, Geyer A, Spreitzer I, Hermann C, Hartung T (2002a) Structural decomposition and heterogeneity of commercial lipoteichoic acid preparations. *Infect Immun* 70:938–944. doi:10.1128/IAI.70.2.938-944.2002
- Morath S, Stadelmaier A, Geyer A, Schmidt RR, Hartung T (2002b) Synthetic lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* is a potent stimulus of cytokine release. *J Exp Med* 195:1635–1640. doi:10.1084/jem.20020322
- Morath S, von Aulock S, Hartung T (2005) Structure/function relationships of lipoteichoic acids. *J Endotoxin Res* 11:348–356. doi:10.1177/09680519050110061001
- Neuhaus FC, Baddiley J (2003) A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 67:686–723. doi:10.1128/MMBR.67.4.686-723.2003
- Nilsen NJ, Deininger S, Nonstad U, Skjeldal F, Husebye H, Rodionov D, von Aulock S, Hartung T, Lien E, Bakke O (2008) Cellular trafficking of lipoteichoic acid and Toll-like receptor 2 in relation to signaling: role of CD14 and CD36. *J Leukoc Biol* 84:280–291. doi:10.1189/jlb.0907656
- Peschel A (2002) How do bacteria resist human antimicrobial peptides? *Trends Microbiol* 10:179–186. doi:10.1016/S0966-842X(02)02333-8
- Ray A, Cot M, Puzo G, Gilleron M, Nigou J (2013) Bacterial cell wall macroamphiphiles: pathogen-/microbe-associated molecular patterns detected by mammalian innate immune system. *Biochimie* 95:33–42. doi:10.1016/j.biochi.2012.06.007
- Reichmann NT, Gründling A (2011) Location, synthesis and function of glycolipids and polyglycerolphosphate lipoteichoic acid in Gram-positive bacteria of the phylum Firmicutes. *FEMS Microbiol Lett* 319:97–105. doi:10.1111/j.1574-6968.2011.02260.x
- Roethlisberger P, Iida-Tanaka N, Hollemeyer K, Heinzle E, Ishizuka I, Fischer W (2000) Unique poly (glycerophosphate) lipoteichoic acid and the glycolipids of a *Streptococcus* sp. closely related to *Streptococcus pneumoniae*. *Eur J Biochem* 267:5520–5530. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01613.x
- Ryu YH, Baik JE, Yang JS, Kang S-S, Im J, Yun C-H, Kim DW, Lee K, Chung DK, Ju HR (2009) Differential immunostimulatory effects of Gram-positive bacteria due to their lipoteichoic acids. *Int Immunopharmacol* 9:127–133. doi:10.1016/j.intimp.2008.10.014
- Schmidt RR, Pedersen CM, Qiao Y, Zähringer U (2011) Chemical synthesis of bacterial lipoteichoic acids: an insight on its biological significance. *Org Biomol Chem* 9:2040–2052. doi:10.1039/C0OB00794C

- Schröder NW, Morath S, Alexander C, Hamann L, Hartung T, Zähringer U, Göbel UB, Weber JR, Schumann RR (2003) Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *J Biol Chem* 278:15587–15594. doi:10.1074/jbc.M212829200
- Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ (1999) Peptidoglycan-and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem* 274:17406–17409. doi:10.1074/jbc.274.25.17406
- Shiraishi T, Yokota S-i, Morita N, Fukiya S, Tomita S, Tanaka N, Okada S, Yokota A (2013) Characterization of a *Lactobacillus gasseri* JCM 1131T lipoteichoic acid with a novel glycolipid anchor structure. *Appl Environ Microbiol* 79:3315–3318. doi:10.1128/AEM.00243-13
- Urdaci MC, Bressollier P, Pinchuk I (2004) *Bacillus clausii* probiotic strains: antimicrobial and immunomodulatory activities. *J Clin Gastroenterol* 38:S86–S90
- Vélez MP, Verhoeven TL, Draing C, Von Aulock S, Pfitzenmaier M, Geyer A, Lambrichts I, Grangette C, Pot B, Vanderleyden J (2007) Functional analysis of D-alanylation of lipoteichoic acid in the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl Environ Microbiol* 73:3595–3604. doi:10.1128/AEM.02083-06
- Weidenmaier C, Peschel A (2008) Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions. *Nat Rev Microbiol* 6:276–287. doi:10.1038/nrmicro1861
- Wicken A, Knox KW (1975) Lipoteichoic acids: a new class of bacterial antigen. *Science* 187:1161–1167. doi:10.1126/science.46620
- Wicken A, Evans J, Knox K (1986) Critical micelle concentrations of lipoteichoic acids. *J Bacteriol* 166:72–77
- Wörmann ME, Corrigan RM, Simpson PJ, Matthews SJ, Gründling A (2011) Enzymatic activities and functional interdependencies of *Bacillus subtilis* lipoteichoic acid synthesis enzymes. *Mol Microbiol* 79:566–583. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07472.x

Résumé

Les probiotiques sont des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité adéquate, peuvent exercer des propriétés bénéfiques sur la santé de l'hôte. Les souches de *Bacillus* utilisées en tant que probiotiques ne sont pas colonisatrices du tractus intestinal, mais sont des résidents transitoires du microbiote. Ce travail fait l'investigation *in vitro* de l'association, qualifiée de synbiotique, entre une souche probiotique de *Bacillus subtilis* et une source carbonée prébiotique, composé alimentaire peu digéré par les enzymes intestinales mais utilisable par les bactéries dans l'intestin. L'étude de cette association met en évidence la capacité de la souche à utiliser les isomaltooligosaccharides (IMOS) prébiotiques comme unique substrat carboné. L'effet positif de ce substrat sur la tolérance à la bile de la souche a été démontré *in vitro*. Les résultats d'une analyse protéomique faisant l'étude des enzymes clés impliquées dans le métabolisme des IMOS, ainsi que d'autres biomarqueurs d'intérêt probiotique, sont en cours d'exploitation. Ce travail préliminaire d'investigation de l'association synbiotique entre les IMOS prébiotiques et la souche probiotique *B. subtilis*, aboutira à des essais *in vivo*. Les effets bénéfiques des probiotiques du genre *Bacillus*, notamment au niveau de la modulation du système immunitaire, résultent de l'interaction entre les molécules de la surface bactérienne et les cellules de l'intestin. Les mécanismes moléculaires à l'origine de l'immunomodulation sont mal connus, alors que leur compréhension est nécessaire à l'optimisation de l'utilisation du probiotique. Un deuxième volet de ce travail concerne la comparaison des structures d'entités moléculaires de surface de trois *Bacilli* probiotiques, les acides lipotéichoïques (LTAs), et leurs activités immunologiques respectives. Une étude structurale des LTAs par des méthodes biochimiques et par RMN a permis de mettre en évidence la diversité structurale au sein du même genre *Bacillus*. Le rôle clé de la D-alanine dans l'activité biologique de ces antigènes bactériens a été démontré.

Mots-clés : *Bacillus* probiotique, prébiotique, synbiotique, protéome, tolérance à la bile, immunomodulation, relation structure-activité, acides lipotéichoïques.

Abstract

Probiotics are live microorganisms, which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host. *Bacillus* probiotic strains are not able to colonize the gut, and are considered as transient residents of the microbiota. Prebiotic are non-digestible food ingredients that could stimulate growth of bacteria in the gut. This work investigates the *in vitro* effect of a prebiotic isomaltooligosaccharide (IMOS) on the growth of a probiotic strain *Bacillus subtilis*. This study highlights the ability of the strain to use IMOS as unique carbon source. A comparative proteomic analysis investigates the main enzymes implicated in the prebiotic metabolism, and biomarkers possibly involved in probiotic effects. This preliminary work, which studies the synbiotic association between a probiotic and a prebiotic, will lead to *in vivo* assays. Beneficial effects of probiotic *Bacilli*, mainly modulation of intestinal immune system, result from interaction between bacterial cell-wall molecules and intestinal cells. The molecular origin of immunomodulatory mechanisms are poorly understood, while understanding is needed to optimize the use of probiotics. A second part of this work consists in comparing the structure of a molecular cell-wall component named lipoteichoic acids (LTA) from three *Bacillus* probiotic, a molecular cell-wall component of Gram positive bacteria, and their immunological activity. A structural study, using biochemical determinations and NMR spectroscopic analysis, highlights the structural diversity between LTAs from different *Bacillus* species. The key role of D-alanine substituents in the biological activity of these bacterial antigens has been demonstrated.

Key words: Probiotic *Bacillus*, prebiotic, synbiotic, proteome, bile tolerance, immunomodulation, structure-activity relationship, lipoteichoic acids.