



HAL
open science

Caractérisation du dialogue entre *Streptococcus thermophilus* et le tractus gastro-intestinal de son hôte

Félix Portello

► **To cite this version:**

Félix Portello. Caractérisation du dialogue entre *Streptococcus thermophilus* et le tractus gastro-intestinal de son hôte. Sciences agricoles. 2012. dumas-00797791

HAL Id: dumas-00797791

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00797791v1>

Submitted on 7 Mar 2013

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

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



MÉMOIRE DE FIN D'ETUDES

MASTER Biologie Appliquée aux Productions et à la Santé Animale

AGROCAMPUS OUEST

Caractérisation du dialogue entre *Streptococcus thermophilus* et le tractus gastro-intestinal de son hôte

Félix PORTELLO

07 juin 2012

Encadrement : Muriel THOMAS
Co-encadrement : Françoise RUL

**UMR 1319 Micalis - Equipes ProbiHôte et ComBac
Interactions des bactéries commensales et probiotique avec l'hôte
Communication et peptides bactériens**

INRA Centre de Jouy-en-Josas
Domaine de Vilvert
78350 Jouy-en-Josas

Remerciements

Je tiens avant tout à remercier mes encadrantes Muriel Thomas et Françoise Rul pour m'avoir accueilli et intégré dans leurs laboratoires respectifs : Muriel pour tes idées explosives, ton aide précieuse en particulier dans les expérimentations animales et pour nos longues conversations critiques de la science, *never give up* ! ; Françoise pour toute la partie microbiologique et surtout pour m'avoir montré la recherche aussi naturellement, enfin pour ton soutien sans faille jusqu'au bout.

Je souhaite remercier aussi Laura Wrzosek, ma thésarde perso, qui m'a appris tant de techniques que tu maîtrisais avec brio et qui, après 3ans de thèse, n'a jamais dit « non » même quand il a fallu m'ouvrir ton bureau ; Marie-Louise Noordine pour le support technique infaillible dans toutes les expérimentations sur l'hôte et pour ton rire communicatif et chaleureux dans le bureau ; Julie Tomas, en thèse, pour avoir fait taire tant de rongeurs mais aussi fait chanter les cigales jusqu'à Jouy-en-Josas ! ; Camille Mayeur pour ta maîtrise de la qPCR, ta connaissance de Applied et des dosages, aussi pour l'ambiance que tu as mise au labo et ta conduite sportive en Audi ou...Kangoo ; Claire Cherbuy pour ta connaissance des bactéries primo, ton bouquin qui m'a tant motivé à venir et ta présence à toute heure ; Véronique Robert pour ton expertise en culture cellulaire, bon courage pour le remplacement progressif de la dinosaure ; Sylvie Miquel pour ton expérience de Post-Doc, ton réalisme, ton accent cantalou et ta simplicité toute clermontoise ; enfin il faut bien remercier les p'tites Masters Julie Reygnier et Marine Leroux pour avoir cru que j'étais un grand au moins au début, merci Marine pour les dosages de Lactate et l'état d'énerverment dans lequel tu as essayé de me maintenir sans succès, pas merci Julie pour avoir été vacciné à mes *blitz krieg* ou au moins avoir réussi à cacher ta surprise.

L'équipe ComBac est aussi largement intervenue au cours de mon stage : Emilie Chambellon qui m'a laissé une place à côté d'elle, m'a montré sa rigueur et son sérieux dans les manip de microbiologie tout en gardant un sens des réalités qui m'a été très précieux dans les moments de doute ; Colette Besset pour tous les gels et les conseils techniques avisés ; Rozenn Gardan pour m'avoir montré comment une ensarienne peut s'épanouir dans la recherche et pour avoir découvert la compétence naturelle de *S. thermophilus* et m'épargner ainsi une belle galère ; Christine pour m'avoir aidé dans mes purifications d'ADN ; Virginie pour le support technique en abondance ; et plus largement toute l'équipe du 526 : Sofian, Christophe G., Vincent, Véronique, Jami-la, Monique, David, Marie qui ont tous eu un moment pour me prêter main forte sans hésitation ou à seulement partager un instant de rigolade.

Merci à Pascal, Amandine, Anne, Fatima et toute l'équipe ANAXEM pour le support animalier et le travail colossal que cela vous demande.

Merci à l'équipe du Dr. Eric Ogier-Denis, Fanny et en particulier Neiké Fernandez pour les expérimentations sur le modèle de souris EXCY2.

Il ne faut penser aussi au reste de l'équipe ProbiHôte qui a été là pour moi : Laure D. pour sa science littéraire et son dynamisme typique Doc'J, Marion L. pour la partie post-labo et les rencontres hasardeuses, Jon pour mettre un peu d'humanité dans ce monde de science, Gaëlle pour la

musique et Stephane parce qu'il faut bien faire publier le labo dans Nature de temps en temps ; je n'oublierai pas tous les stagiaires, thésards, post-Doc, titulaires, retraités que j'ai rencontré mais aussi tous ceux partis en laissant leur empreinte indélébile entre les murs du R-2 ou du 526. Et parce que la science se fait à plusieurs, une pensée particulière aux chefs de l'équipe ProbiHôte Philippe, Jean-Marc, Luis, Olivier et toutes leurs discussions de haut vol aux réunions. Une pensée toute particulière pour Philippe dont j'ai suivi le parcours depuis les Alpes jusqu'à Jouy et qui aura été mon premier contact au labo, bravo pour ta proximité avec tous les membres du labo, ton assurance et ta capacité à mettre la recherche à la portée de tous et de chacun, je pense que c'est une grande qualité bien que rare.

Je remercierai enfin tous ceux qui m'ont soutenu hors du labo : Tiphaine avec tant de compréhension même quand c'était dur, Pauline pour l'immuno et les fat repas made in Grolloc, la Mollithe pour ta geekitude salvatrice loin de toute science, Manon, Paul, toute l'asso Doc'J, les résidents de l'INRA Calum, Chris, Arunima, Doreen, Ola, Goshia, Imane, David et les rencontres de passage, les amis de l'ouest et l'est, et le côté parisien ou pas de la famille. Vous m'avez tous soutenu à votre manière et sans forcément y prétendre, c'était pas de refus !

Je ne remercierai pas les clones faux positifs de *S. thermophilus*, l'appareil qPCR qui plante en manip, les parisiens mégalo ni le passant qui m'a indiqué le mauvais hôpital parisien le matin du lundi 4 mai 2012.

Bref, je remercie toutes ces rencontres plus ou moins passagères avec qui mes rapports furent aussi divers qu'enrichissants, les autres attendront.

Table des matières

Introduction	3
I. Microbiote digestif et côlon : un écosystème intégré	4
A. Le côlon, un organe de transit et d'échanges	4
B. Le microbiote, une population bien intégrée dans le TGI	4
II. Aspects probiotiques du microbiote intestinal : exemple d'une bactérie de l'alimentation, <i>Streptococcus thermophilus</i>.....	5
A. Les probiotiques : définition, législation, enjeux	5
B. <i>S. thermophilus</i> : une bactérie à usage humain	7
1. Phylogénie et caractéristiques : à l'origine des enjeux sociétaux	7
2. Une bactérie au service de l'homme.....	8
III. Effets de <i>S. thermophilus</i> sur la différenciation du TGI	13
Résultats et Discussion	14
I. Effets de <i>S. thermophilus</i> sur la différenciation du TGI	14
A. Approche préliminaire	14
B. Résultats & Discussion	15
C. Expériences complémentaires	15
II. Influence du TGI sur le métabolisme de <i>S. thermophilus</i>	16
III. Effet de <i>S. thermophilus</i> sur l'inflammation déclenchée par un défaut de mucus	18
Conclusion	19
Matériel et Méthodes	20
I. Souches et conditions de culture bactérienne	20
II. Conditions d'expérimentation animale	20
III. Croissance de <i>S. thermophilus</i> LMD-9 en présence de différents sucres	21
IV. Culture de lignée cellulaire et incubation avec du lactate	21
V. Extraction des cellules, protéines et ARN du côlon	22
VI. Dosage des ARN_m et mesure de l'expression des gènes par RT-qPCR chez le rat.....	22
VII. Extraction des ARN des cultures cellulaires	23
VIII. Construction du mutant <i>S. thermophilus</i> délété pour le pseudogène <i>ster_0152</i>.....	23
IX. Analyses statistiques	24
Références bibliographiques	25

Glossaire

AEBSF : 4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride
AFSSA : Agence française de sécurité sanitaire des aliments
ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
BCL2 : B-cell lymphoma 2
BSA : Bovin serum albumin
CFU : Colonie formant unité
DMEM : Dulbecco's modified eagle media
DO : Densité optique
DSS : 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid
EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique
EFSA : European Food Safety Association
ERK : Extracellular signal-regulated kinases
FAO : Food and agriculture organization
FDA (USA) : Food & Drug Administration
GRAS : Generally recognized as safe
HES : Hématoxyline Eosine-saffran
IFN γ : Interferon gamma
IgA : Immunoglobuline A
IgE : Immunoglobuline E
IL- : Interleukine
INRA : Institut national de la recherche agronomique
I κ B : inhibitor of kappa B
JNK : c-Jun N-terminal kinase
KLF4 : Krueppel-like factor 4
MCD : Milieu chimiquement défini
MICI : Maladie inflammatoire chronique de l'intestin
MTX : Méthotrexate
NF κ B : nuclear factor-kappa B
OMS : Organisation mondiale de la santé
P3K : Phosphoinositide 3-kinase
PAS : periodic acid-Schiff
PBS : phosphate buffered saline
PCNA : proliferating cell nuclear antigen
QPS : Qualified presumption of safety
RIN : RNA integrity number
RT-qpcr : reverse transcription quantitative polymerase chain reaction
TFF3 : trefoil factor 3
TGF β : growth factor beta
TGI : Tractus gastro-intestinal
TNBS : 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid
TNF α : Tumor necrosis factor alpha
ZO-1 : zonula occludens 1

Introduction

Le *microbiote* est l'ensemble des micro-organismes situé dans un environnement spécifique. Les progrès technologiques récemment accomplis par l'avènement du séquençage à haut-débit ouvrent des pistes de compréhension du microbiote intégré dans sa vaste diversité de biotopes : sol, océan, biofilm de surface, matrice alimentaire, surface d'échange végétale et animale, ... L'étude du microbiote gastro-intestinal en particulier connaît depuis les années 2000 un essor considérable avec un nombre de publications scientifiques multiplié par 5 en 20 ans (Sekirov *et al.* 2010). On peut aujourd'hui considérer les nombreuses retombées de cette activité de recherche sur l'industrie agro-alimentaire à la recherche de nouvelles propriétés technologiques pour ses ferments, sur l'industrie pharmaceutique pour le développement de nouvelles thérapies non médicamenteuses et sur la médecine pour la lutte contre les micro-organismes pathogènes. Ce regain d'intérêt sociétal pour ce domaine à fort potentiel économique a entraîné des dérives que l'on a pu constater avec les allégations santé non prouvées pour des produits de consommation en particulier les yaourts. Leur fournisseur a été attaqué par la justice états-unienne pour publicité mensongère en 2008 (Nathalie 2008) et a fini par retirer ses demandes d'allégations auprès de l'EFSA en 2010 (Challenges 2010). Ces abus ont entraîné une méfiance collective à l'égard de ces « aliments » qu'assume désormais leur fournisseur avec une chute des ventes de ces produits (Masson 2009). Ce scepticisme ne doit cependant pas se généraliser aux propriétés de santé du microbiote et la parole doit être rendue à la communauté scientifique pour faire la distinction entre les effets démontrés et les stratégies marketing.

Ce mémoire portera sur l'étude de *Streptococcus thermophilus*, une bactérie du yaourt, le seul aliment reconnu probiotique par l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA 2010a). Dans une première phase introductive, après une présentation du microbiote et du côlon, le principal organe de résidence de la flore microbienne chez l'homme, je recenserai les différentes utilisations des bactéries dans les procédés alimentaires avant de me concentrer uniquement sur *S. thermophilus*, sa structure génomique, ses propriétés probiotiques et les effets cellulaires impliqués. Dans une deuxième partie de ce mémoire je me pencherai spécifiquement sur les recherches que j'ai développées dans l'unité Micalis de l'INRA au sein des équipes ProbiHôte et ComBac dans le cadre de mon stage de fin d'études d'ingénieur en agronomie. Ce stage conduit sous la direction de Muriel Thomas (équipe ProbiHôte) et Françoise Rul (équipe ComBac) a porté sur les capacités d'implantation de *S. thermophilus* dans le tractus gastro-intestinal (TGI) et les effets que cela induit aussi bien sur l'hôte que sur la bactérie elle-même.

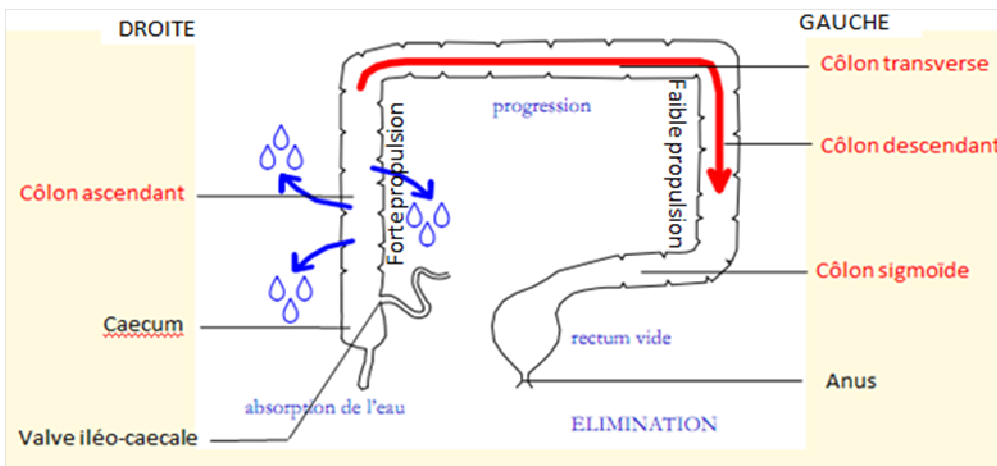


Figure 1 : Schéma structural et fonctionnel de la mécanique digestive au cours du transit dans le côlon humain. Le côlon est organisé en quatre portions : ascendant, transverse, descendant et sigmoïde, avant de déboucher sur le rectum fermé par l'anus. Extrait et adapté de (Rofidal 2004)

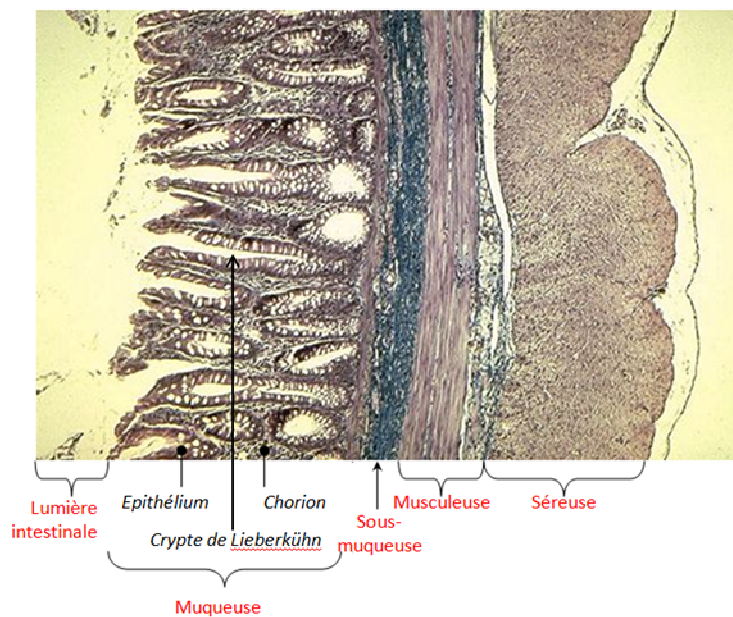


Figure 2 : Coupe transversale de côlon humain observée au microscope optique x40. Le côlon possède quatre tuniques constitutives : une muqueuse comprenant l'épithélium et la lamina propria, une sous-muqueuse, une musculature et une séreuse. L'épithélium présente de nombreuses invaginations dans la lamina propria qui forment les cryptes (ou glandes) de Lieberkühn. Extrait de (Denef 1996) puis légendé.

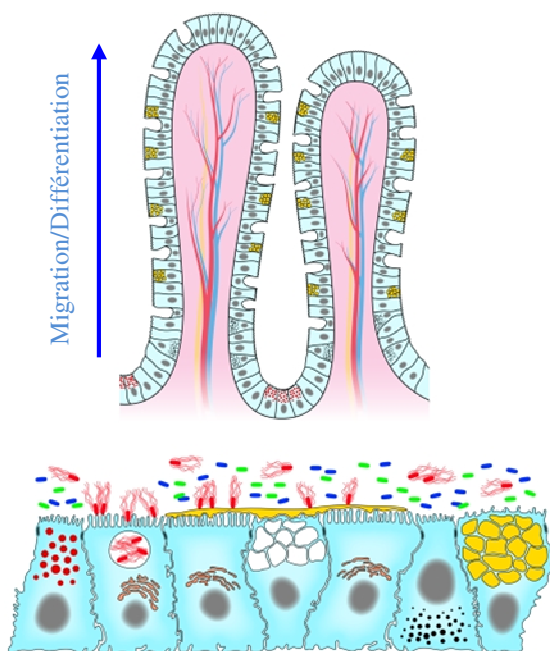


Figure 3 : Représentation schématique d'une coupe de l'épithélium colique structuré en cryptes le long desquelles migrent les cellules en se différenciant. L'épithélium est constitué de colocytes (appareil de golgi en évidence), de cellules entéro-endocrines (vésicules de sécrétion) et de cellules en gobelets (gouttelettes de mucus). Extrait de (Lièvin-Le Moal & Servin 2006).

I. Microbiote digestif et côlon : un écosystème intégré

L'Homme est en contact direct avec son environnement depuis ses épithéliums (peau, paroi digestive, muqueuses) qui deviennent potentiellement des sites de colonisation pour les micro-organismes. Le tractus digestif représente la plus grande surface de contact avec l'environnement et compte une grande communauté bactérienne, le microbiote intestinal, constitué de plus de 1000 espèces par individu (Qin *et al.* 2010). Le principal site de résidence de ce microbiote est le côlon où le transit est ralenti, le milieu anaérobie et le pH proche de la neutralité. Je détaillerai dans un premier temps cet organe et son fonctionnement avant de présenter le microbiote intestinal.

A. Le côlon, un organe de transit et d'échanges

Le côlon est un segment du gros intestin entre le caecum et le rectum : il mesure 1,5 m chez l'homme et peut être séparé en quatre portions (figure 1). La paroi du côlon dessine des plis musculaires animés de contractions dépendantes de l'état physiologique du sujet qui assurent une propulsion et un brassage du contenu. La matière arrivant dans le caecum est déjà privée de l'essentiel de ses nutriments ainsi que d'une large partie de son volume d'eau. Les résidus non digestibles, les sécrétions microbiennes, les minéraux et l'eau arrivent dans le côlon sous forme liquide, ils constituent le *bol fécal* qui s'imprègne des sécrétions intestinales : le *chyle* (Rofidal 2004).

Le côlon se compose de quatre tuniques caractéristiques présentées dans la figure 2. On trouve trois types cellulaires dans le côlon (figure 3) : les colonocytes, les cellules absorbantes polarisées qui représentent 80% des cellules épithéliales coliques ; les cellules entéro-endocrines, minoritaires qui libèrent les sécrétions hormonales et les cellules en gobelets sécrétrices d'un mucus protecteur contre les agressions physico-chimiques et microbiologiques (Cherbuy *et al.* 2004). Les fonctions du mucus seront développées dans une dernière partie.

Les cellules des cryptes sont constamment renouvelées par un système de migration depuis des cellules souches en division en profondeur qui se différencient au fur et à mesure de leur progression (figure 3). Une fois arrivées à l'épithélium de surface, les cellules des cryptes finissent par se desquamer, elles sont libérées dans la lumière intestinale et recyclées par la flore microbienne. On observe expérimentalement une quantité stable de cellules par cryptes qui traduit une homéostasie entre la division cellulaire des cellules souches et la desquamation (Falk *et al.* 1998), ce phénomène assure l'intégrité du tissu épithélial (Hermiston *et al.* 1994; Freund 2000).

B. Le microbiote, une population bien intégrée dans le TGI

Depuis l'ingestion alimentaire jusqu'à l'excrétion, les aliments et leur bagage microbien sont soumis à différentes pressions environnementales selon les segments du tube digestif et leur envi-

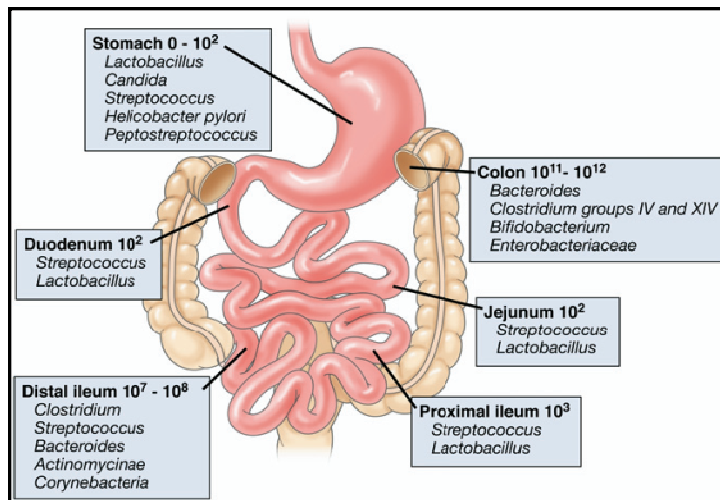


Figure 4 : Répartition qualitative et quantitative de la population microbienne dans le tractus digestif. Le côlon est la section du système digestif le plus riche en micro-organismes. Extrait de (Sartor 2008).

ronnement physico-chimique qui établissent un gradient de population microbienne croissant dans le sens oral-anal jusqu'à atteindre 10^{11} CFU/g de contenu dans le côlon (Sartor 2008).

On observe parmi les 10^{14} micro-organismes peuplant la flore intestinale une large diversité de population. Bien que 99% de cette flore soit constituée de bactéries anaérobies strictes dont plus de 50% ne sont toujours pas cultivables *in vitro*, les études de métagénomique ont recensé plus de 1000 espèces grâce au séquençage du microbiote total de plus d'une centaine d'européens (Qin *et al.* 2010). Au cours du transit de la flore dans le tube digestif, on observe le passage de bactéries dominantes aéro-anaérobies facultatives (*Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterobacteriaceae*) dans l'intestin grêle à une flore essentiellement anaérobie (groupes majoritaires : *Bacteroides-Prevotella*, *Clostridium coccooides-Eubacterium rectale* et *Clostridium leptum*) dans le côlon (Ducluzeau and Raibaud 1979; Coudeyras and Forestier 2010) (figure 4).

La colonisation du tube digestif par les bactéries engendre des interactions entre bactéries et hôte dont les conséquences physiologiques peuvent toucher de nombreuses fonctions de l'hôte dont en particulier le système immunitaire, la structure de l'épithélium ainsi que la proportion des espèces constitutives de la flore.

II. Aspects probiotiques du microbiote intestinal : exemple d'une bactérie de l'alimentation, *Streptococcus thermophilus*

A. Les probiotiques : définition, législation, enjeux

Les probiotiques sont selon la FAO et l'OMS « des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent des effets positifs sur la santé, au-delà des effets nutritionnels traditionnels » (FAO/OMS 2001). Ils représentent aujourd'hui un domaine d'intérêt encore imparfaitement connu mais en pleine croissance. Les enjeux pharmaceutiques et médicaux se dessinent peu à peu alors que de nombreuses mises sur le marché ont déjà été opérées avec succès. Les bactéries lactiques sont considérées comme les principaux probiotiques potentiels avec la levure *Saccharomyces boulardii*. Les différents produits commercialisés et les effets de santé envisagés sont clairement résumés et rigoureusement référencés sur le site internet passeportsante.net par le professeur P. Haddad de l'université de Montréal (Haddad 2010). Les probiotiques interviennent directement sur l'hôte ou par l'influence de l'écosystème microbien.

La nature de la flore intestinale dépend des paramètres physico-chimiques du tractus dont le taux d'oxydation, la concentration en sels biliaires et l'acidité peuvent être modifiés par les activités métaboliques microbiennes, l'alimentation et les conditions physiopathologiques (Chain *et al.* 2012). La représentativité des espèces pathogènes peut aussi être modifiée par des effets antimicrobiens *via* les bactériocines, des peptides antimicrobiens membranotrophes (Drider *et al.* 2012).

Ces bactériocines peuvent être utilisées sous la forme probiotique avec l'emploi de *Lactobacillus salivarius* contre *Campylobacter jejuni* (Messaoudi *et al.* 2011), ou bien sous une forme purifiée avec un seul exemple à ce jour : la nisine (E234) isolée à partir de *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* et qui a été autorisée en 2006 à être mise sur le marché en tant qu'additif conservateur dans les œufs et les dérivés laitiers (EFSA 2006). Les probiotiques sont aussi susceptibles de lutter contre des effets bactériens pathogènes par l'inhibition de l'adhésion ou de l'internalisation de certaines espèces : cette stratégie est envisagée pour lutter contre les mammites causées par *Staphylococcus aureus* avec *Lactobacillus casei* (Bouchard *et al.* 2012).

Les probiotiques interviennent aussi directement sur la physiologie de l'hôte en limitant l'impact des pathogènes et en régulant la réponse immunitaire. En particulier dans des situations de réponse immunitaire excessive (stress, allergie, pathologie inflammatoire), des probiotiques seraient capables d'induire un effet anti-inflammatoire par une modulation de la production des effecteurs de la réponse inflammatoire. Deux principales stratégies ont été adoptées - notamment par mon laboratoire d'accueil - pour identifier de telles souches probiotiques : *in vitro* un screening à haut-débit des interleukines produites lors d'une co-incubation des souches avec des lignées cellulaires (Santos Rocha *et al.* 2012), et *in vivo* une approche métagénomique des dysbioses observées dans le microbiote de patients atteints de pathologies inflammatoires récurrentes (Sokol *et al.* 2008). Enfin l'usage des probiotiques est envisagée dans les situations d'altération de l'intégrité de l'épithélium liées à des inflammations pathologiques (Maladie de Crohn, Syndrome de l'intestin irritable, Rectocolite Hémorragique), des invasions pathogènes (*Helicobacter pylori*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*,...) ou des situations de stress (Soderholm *et al.* 2002; Ohland and Macnaughton 2010). Ces situations peuvent induire une augmentation de la perméabilité intestinale et une diminution de l'épaisseur voire une discontinuité de la couche de mucus qui lèvent la barrière protectrice épithéliale (McCormick *et al.* 1990; Kim and Ho 2010). Un traitement préventif ou au cours de l'expérience par *L. farciminis* a montré une capacité à inhiber la contraction des jonctions serrées induite par un stress de manière à renforcer l'intégrité de la barrière épithéliale et à empêcher son altération (Ait-Belgnaoui *et al.* 2006; Zareie *et al.* 2006). Ces effets ont été compilés dans (Ohland and Macnaughton 2010).

Parmi l'ensemble des bactéries potentiellement probiotiques actuellement envisagées, je me limiterai à l'étude des effets de *S. thermophilus* pris seul ou au sein du milieu yaourt en présence ou non de son ferment associé *L. bulgaricus*.

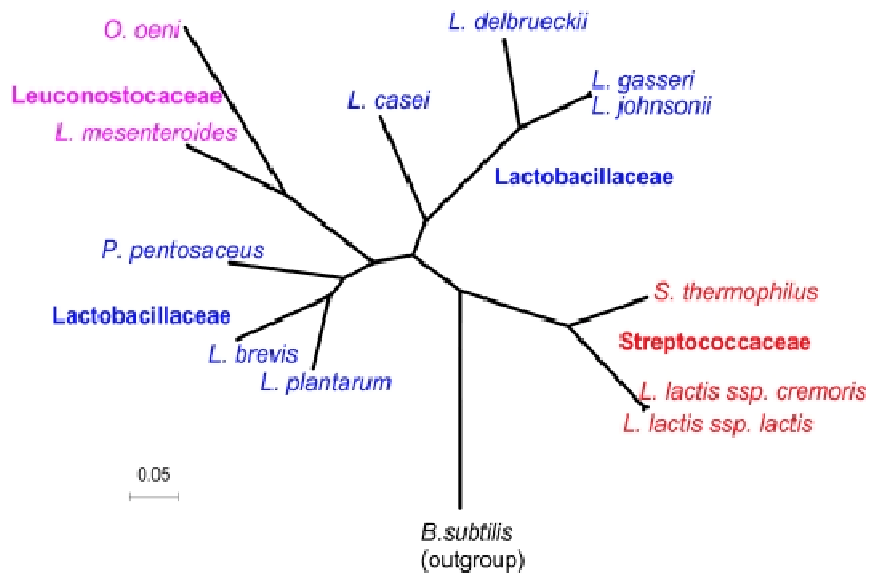


Figure 5 : Arbre phylogénétique de l'ordre des *Lactobacillales* construit sur la base de protéines ribosomales. Les espèces sont colorées selon la taxonomie actuelle. D'après (Makarova *et al.* 2006)

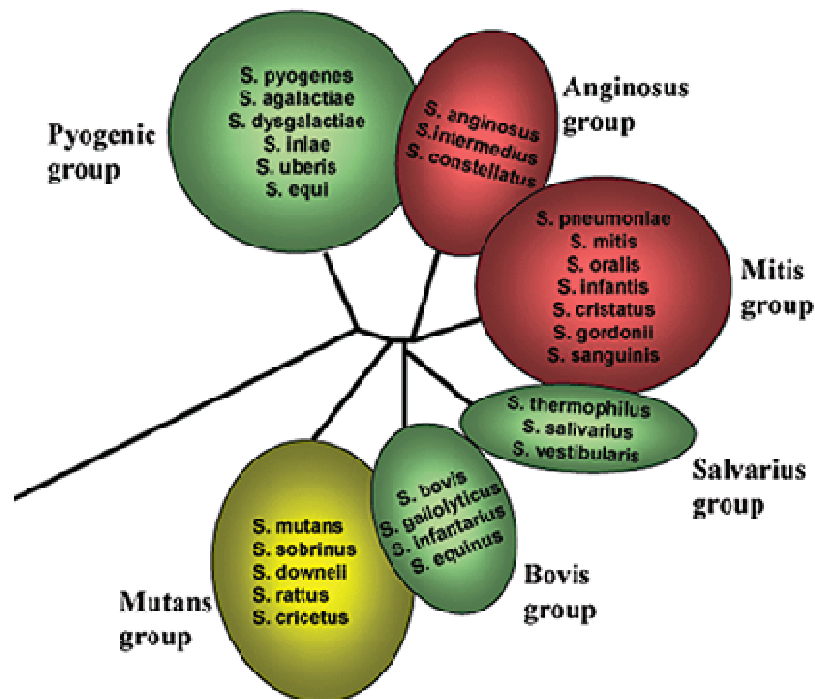


Figure 6 : Arbre phylogénétique du genre *Streptococcus* basé sur les séquences d'ARN16S. Tiré de (Havarstein 2010)

Souches <i>S. thermophilus</i>	Taille (Kpb)	% G+C	% gènes codants	Nombre de gènes associés à des voies métaboliques
CNRZ1066	1796	39.08	85	864
LMG18311	1796	39.09	85	820
LMD-9	1856	39.07	78	788
ND03	1831	39.1	94	
JIM8232	1929	38.9	81.3	

Tableau 1 : Comparaison des cinq souches de *S. thermophilus* séquencées. Tiré de (Ben-Yahia 2012)

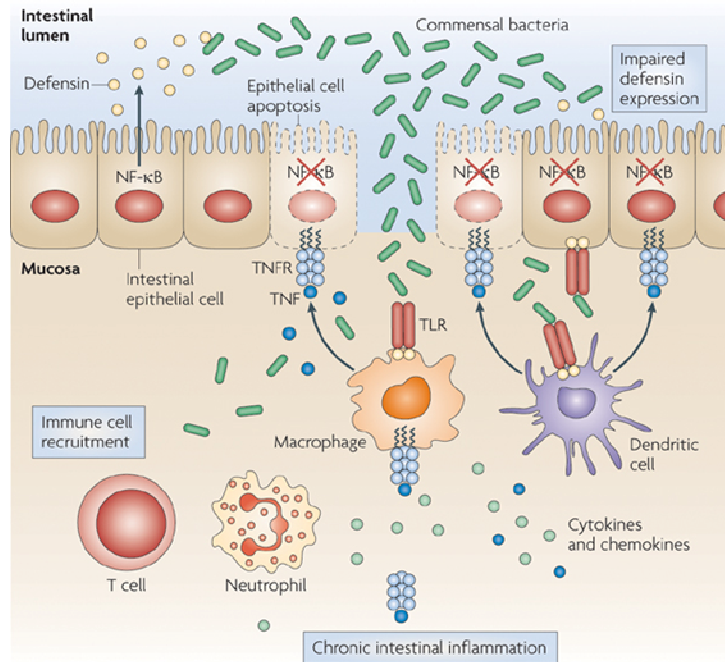
B. *S. thermophilus* : une bactérie à usage humain

1. Phylogénie et caractéristiques : à l'origine des enjeux sociétaux

Le genre *Streptococcus* fait partie de la division des *Firmicutes* - l'un des deux grands phyla du microbiote digestif avec les *Bacteroidetes* - de la classe des *Coccus* et de l'ordre des *Lactobacillales*. Il désigne des bactéries à Gram positif et comprend de nombreuses espèces pathogènes mais aussi des commensaux très présents dans l'environnement. Parmi cette grande diversité, *S. thermophilus* est une bactérie alimentaire habituelle du milieu laitier animal ou maternel retrouvée dans le tractus gastro-intestinal très précocement chez les nourrissons (Solis *et al.* 2010) et chez 90% des individus (Qin *et al.* 2010). *S. thermophilus* est phylogéniquement proche de deux bactéries en particulier : *Lactococcus lactis*, le ferment laitier majeur et le plus étudié, et *Streptococcus salivarius*, une bactérie commensale isolée de la cavité buccale et dont *S. thermophilus* était considéré comme une sous-espèce jusqu'en 1991 (Schleifer 1991) (figures 5 & 6).

S. thermophilus est une bactérie lactique homofermentaire, elle tire son énergie de la fermentation lactique des sucres en produisant majoritairement du lactate, son métabolisme atteint son maximum d'efficacité autour de la température corporelle des animaux poïkilothermes. On considère que l'innocuité de *S. thermophilus* a été démontrée par sa consommation dans les laits fermentés depuis les premiers procédés de fermentations du lait en Egypte antique il y a 9000ans en parallèle avec l'apparition de l'élevage. Cette bactérie est le seul Streptocoque possédant les appellations QPS (Qualified Presumption of Safety) par l'Europe (EFSA 2007) et GRAS (Generally Recognized As Safe) par les Etats-Unis (FDA 2002; FDA 2012) qui permettent son utilisation généralisée dans l'industrie agro-alimentaire et pharmaceutique. Il est important de souligner ici l'importance de *S. thermophilus* pour la production du yaourt dont il est l'une des deux bactéries entrant dans la définition selon le Codex Alimentarius (norme n°A-11 (a)(1975)) et la législation française (n°88-1203 1988) à la condition qu'au moins 10^7 CFU/g soient dénombrables.

De nombreuses souches de *S. thermophilus* ont été utilisées dans les procédés agro-alimentaires dont plusieurs ont été isolées et étudiées, et cinq ont été séquencées : CNRZ1066, LMG 18311, LMD-9, ND03, JIM8232 (Bolotin *et al.* 2004; Makarova *et al.* 2006; Delorme *et al.* 2011; Sun *et al.* 2011). Les propriétés génomiques de ces souches ont été compilées par L. Ben-Yahia (tableau 1). Cette bactérie présente une compétence naturelle de transformation lui permettant d'internaliser de l'ADN libre présent dans le milieu et de l'intégrer dans son génome. Cette propriété désormais bien comprise et maîtrisée a été mise en évidence par mon laboratoire d'accueil (Gardan *et al.* 2009) et est employé pour la construction de souches recombinantes comme je le détaillerai dans ce mémoire.



Nature Reviews | Immunology

Figure 7 : Organisation du système immunitaire de la barrière épithéliale. L'épithélium sécrète des peptides antimicrobiens (défensines), les cellules épithéliales intestinales empêchent physiquement les bactéries de pénétrer dans l'organisme (à gauche). L'inhibition du facteur NFκB induit l'apoptose des cellules épithéliales et diminue l'expression des peptides antimicrobiens ce qui lève la barrière épithéliale et permet l'invasion de la muqueuse colique par les bactéries commensales, provoquant une colite chronique sévère. TLR = Toll-like receptor. Tiré de (Pasparakis, 2009).

2. Une bactérie au service de l'homme

Comme nous l'avons vu précédemment, *S. thermophilus* est largement utilisé dans la production de produits lactés et fromages. Cependant, pris isolément, au sein du milieu yaourt ou dans un cocktail avec d'autres bactéries lactiques, on lui prête également des propriétés probiotiques potentielles dont une a déjà été reconnue officiellement.

En effet en 2010, l'EFSA a accordé une allégation santé pour le yaourt dans la digestion du lactose chez les personnes atteintes d'une intolérance au lactose (EFSA 2010a). Le rapport précise l'importance de la présence d'au moins 10^8 CFU dans la portion ingérée. Ce rapport s'appuie sur plusieurs études ayant comparé sur des cohortes humaines intolérantes au lactose les effets de différents yaourts fermentés par *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* par rapport à différents produits à base de lait non fermenté, fermenté avec d'autres ferments, de yaourt thermisé et d'eau lactosée. Ces études ont conclu à une augmentation significative de l'absorbance du lactose en présence de yaourt contenant un nombre suffisant des deux ferments du yaourt sans distinction significative entre les différentes marques de yaourt (EFSA 2010b), les résultats ont été compilés dans (Ben-Yahia 2012).

Il faut aussi noter que *S. thermophilus* entre dans la composition d'un probiotique commercialisé sous le nom de « VSL#3 » qui contient 5.10^{11} CFU/g avec, en plus de *S. thermophilus*, une combinaison de 3 souches de *Bifidobacteria* (*B. longum*, *B. infantis*, *B. breve*) et 4 souches de *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus*, *L. plantarum*). Plusieurs études convaincantes proposent des effets anti-inflammatoires sur le traitement de la pochte notamment (Gionchetti *et al.* 2003; Mimura *et al.* 2004). Je n'évoquerai pas ces études dans lesquelles on ne peut pas mesurer l'importance de *S. thermophilus*.

Les effets de *S. thermophilus* et du yaourt ont été étudiés pour la lutte contre les pathogènes, le cancer colorectal, les inflammations intestinales de l'intestin, les diarrhées et les allergies. Je présenterai dans un premier temps les études réalisées sur ces pathologies puis dans un deuxième temps je développerai plus spécifiquement les effets sur la fonction de barrière de l'épithélium.

a) Effets sur les pathologies

(1) MICI

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont des pathologies chroniques où une région de l'intestin développe une forte réponse immunitaire. Ces maladies incluent la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique (Podolsky 2002) pour lesquels des modèles expérimentaux animaux ont démontré la nécessité et l'importance de la flore intestinale pour le développement de ces pathologies (Sartor 1997) (figure 7).

Des modèles animaux de colite induite par des agents chimiques souvent acides (Acide acétique, TNBS, DSS, Oxazolone) ou des invalidations de gènes ont permis d'évaluer les effets de *S. thermophilus* sur ces pathologies. Les effets varient suivant le modèle utilisé cependant la majeure partie des études recensent des effets anti-inflammatoire de *S. thermophilus* et du yaourt. Les voies mises en évidence sont une inhibition des IgA (Gobbato *et al.* 2008) et de la voie NFκB avec la stimulation de la réponse T régulatrice (Carroll *et al.* 2007; Rodriguez *et al.* 2010; Donkor *et al.* 2012). Des réponses pro-inflammatoires sont cependant aussi recensées (De Simone *et al.* 1986; Meyer *et al.* 2007). La voie NFκB est une voie très couramment employée pour tester des propriétés modulo-inflammatoires, il faut cependant se rendre à l'évidence que la signification et les mécanismes d'action ne sont pas pleinement élucidés. Une étude a comparé l'effet de bactéries probiotiques sur la voie NFκB dans deux modèles cellulaires intestinaux différents, en montrant des effets souvent radicalement opposés en fonction du modèle cellulaire choisi et de la souche (Lakhdari *et al.* 2011). Il est légitime de critiquer la pertinence de ces modèles et des conclusions que l'on peut en tirer sur la modulation réelle de la réponse inflammatoire. Des études compilées dans (Pasparakis 2009) sur les conséquences de l'inhibition et la stimulation de cette voie dans les cellules non-immunitaires en particulier dans l'épithélium intestinal ont conduit à repenser cette voie non plus comme une voie pro-inflammatoire mais comme un garant de l'intégrité épithéliale.

(2) Allergies

Les cas recensés d'allergies sont en pleine augmentation dans les pays occidentaux notamment européens selon l'ANSES (Dubuisson *et al.* 2002). On pourrait attribuer cette augmentation à la diminution de l'exposition précoce aux allergènes potentiels à cause de l'urbanisation. La flore intestinale a été évoquée pour lutter contre cette tendance par le basculement de la réponse immunitaire *T helper* vers un rééquilibrage de la balance Th1/Th2 et éviter un redirigement de la réponse immunitaire Th2 vers des antigènes alimentaires et environnementaux. Cet état des lieux a été réalisé par une commission de l'AFSSA réunissant des scientifiques, des membres de l'AFSSA et des industriels (notamment de l'industrie laitière) (P. Marteau 2005) au cours de laquelle le yaourt a été présenté potentiellement comme un bon facteur de lutte contre l'atopie mais qui demande la poursuite d'études sur modèles animaux (Pene *et al.* 1988; Halpern *et al.* 1991; Miettinen *et al.* 1998) et de cohorte (Van de Water *et al.* 1999). Une étude récente sur les effets de la consommation de yaourt a conclu à un effet protecteur sur la dermatite atopique (Roduit *et al.* 2012).

Enfin des études sur *S. thermophilus* en particulier ont montré sa capacité à induire la production de l'IFNγ, un inhibiteur de la production d'IgE issue de la réponse inflammatoire Th2 (Peng

et al. 2007; Ongol *et al.* 2008). L'administration à une cohorte de 129 enfants de yaourt fermenté avec *S. thermophilus* et *B. breve* a diminué leur sensibilité allergique (Morisset *et al.* 2011).

(3) Capacités anti-diarrhéiques

La diarrhée est un symptôme commun souvent bénin mais qui peut s'avérer particulièrement dangereux pour l'enfant. Selon une étude de l'OMS elle représente le deuxième facteur de mortalité soit 18% des décès recensés pour les enfants de moins de 5 ans (Bryce *et al.* 2005). Les premières initiatives probiotiques pour le traitement des diarrhées remontent à l'aube du XX^{ème} siècle avec Ilya Ilyich Metchnikoff (prix Nobel de Médecine 1908) qui proposait un rôle des bactéries du yaourt (Metchnikoff 1901). Les études actuelles ont démontré un effet significatif d'une supplémentation en *S. thermophilus* sur l'incidence des diarrhées chez l'enfant et la présence de rotavirus, le principal facteur des diarrhées aiguës (Saavedra *et al.* 1994; Canani *et al.* 2007). Ces effets s'avèrent ici plus efficaces que *S. boulardii*, le probiotique déjà commercialisé pour ces symptômes et détenant une allégation reconnue en Allemagne (Commission 1998; Eren *et al.* 2010).

(4) Capacités anti-pathogènes

La capacité des probiotiques à lutter contre les pathogènes du TGI ouvre la voie à une méthode plus douce et intégrée que l'antibiothérapie brutale pour la flore intestinale et qui conduit à des diarrhées chez 30% des patients traités (McFarland 1998; Barbut and Meynard 2002).

S. thermophilus dans son aliment yaourt a montré une capacité à stimuler le système immunitaire de manière à induire la production des IgA sécrétoires, véritables clés de voûte de la lutte antimicrobienne, chez des souris infectées ou saines (Perdigon *et al.* 1995; Puri *et al.* 1996). En outre *S. thermophilus* a montré des capacités à inhiber la croissance de *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, et *T. nigrescens* (Zhu *et al.* 2010). Des études sur *H. pylori*, une bactérie pathogène de l'intestin retrouvée chez 90% des patients atteints d'ulcères duodénaux, ont observé que le yaourt était capable d'inhiber la croissance d'une majorité des souches de ce pathogène *in vitro* et en diminuait la séoprévalence *in vivo* (Duggan 2002; Ornelas *et al.* 2007; Boyanova *et al.* 2009).

(5) Cancer colorectal

Le cancer colorectal est le cancer le plus fréquent avec 13% des cas à égalité avec les cancers du sein et du poumon en Europe (Boyle and Ferlay 2005). La modification des facteurs environnementaux par la flore intestinale a une influence sur l'incidence du cancer et la consommation de produit laitier en serait un facteur de diminution (Peters *et al.* 1992; Pala *et al.* 2011). Des études sur lignées cellulaires et animaux ont montré que le yaourt diminuait le développement des tumeurs par rapport à du lait non fermenté. Toutefois *L. bulgaricus* semble davantage être la bacté-

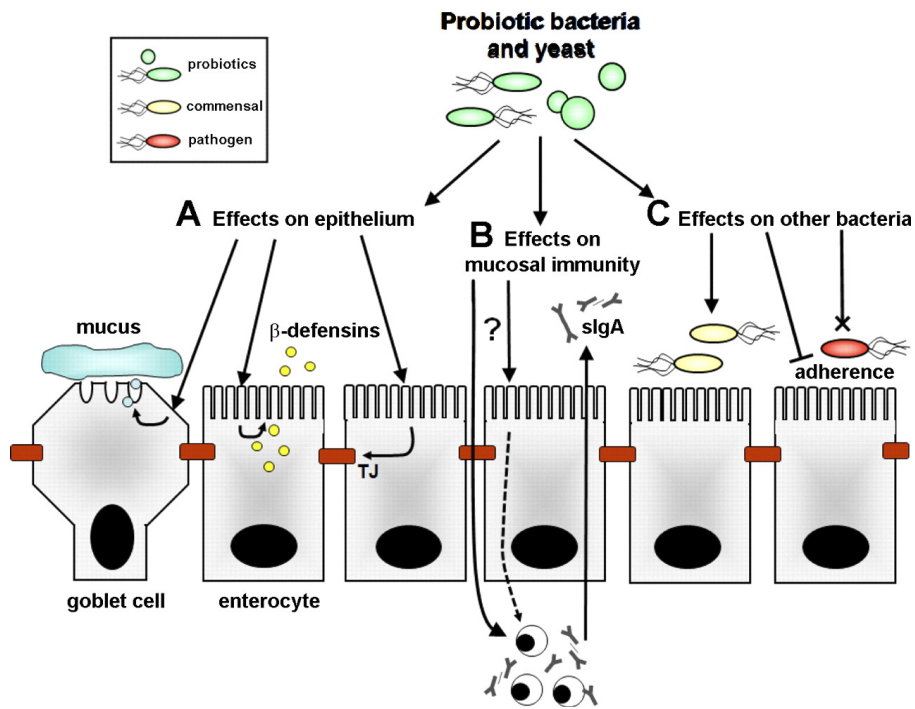


Figure 8 : Effets des probiotiques sur la barrière épithéliale intestinales. A : induction de la production par l'hôte de mucines, de peptides anti-microbiens et solidarisation de l'épithélium. B : induction de la production d'effecteurs de la réponse immunitaire de l'hôte. C : modification de la flore résidente par une altération des facteurs trophiques et la sécrétion de peptides pro- ou antimicrobiens. Tiré de (Ohland and MacNaughton 2010).

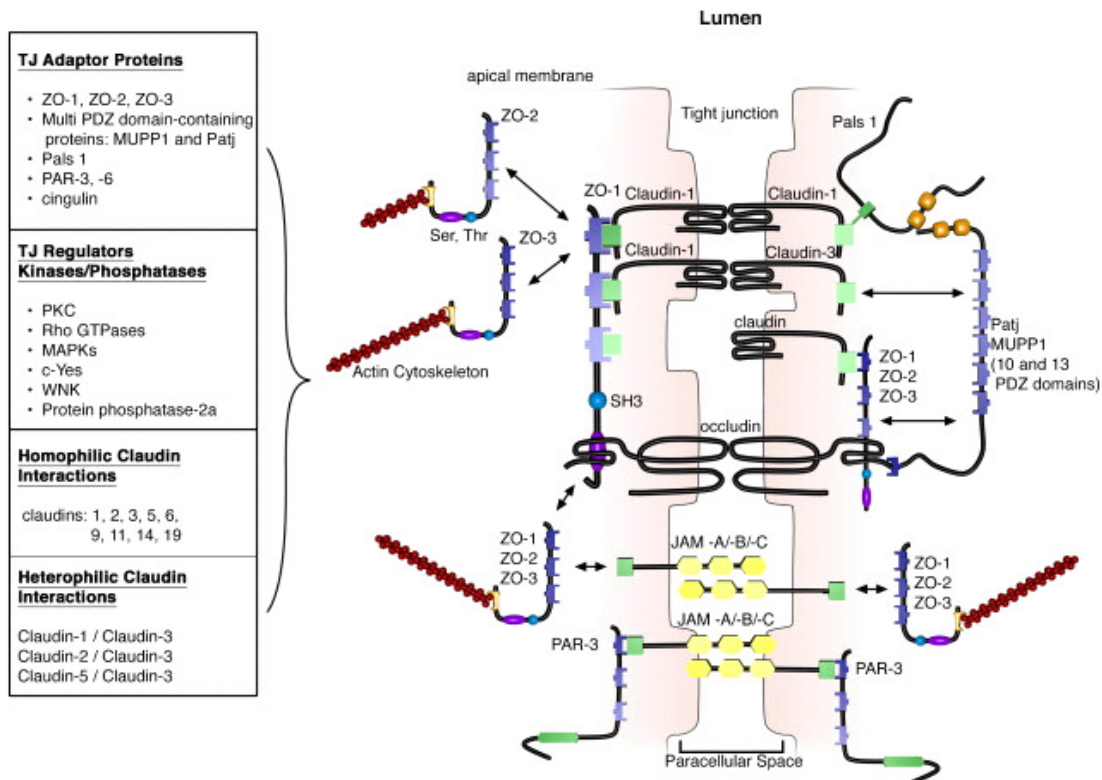


Figure 9 : Organisation des jonctions serrées de l'épithélium intestinal en molécules cytosoliques qui permettent l'ancrage des molécules intramembranaires qui elles-même interagissent avec des molécules complémentaires ancrées dans les cellules voisines. *S. thermophilus* induit la synthèse de ZO-1 cytosolique et des occludines intramembranaires. Tiré de (Katherine, et al 2009).

rie responsable de cet effet *via* une modulation de la réponse immunitaire et une stimulation de l'apoptose (Wollowski *et al.* 1999; de Moreno de Leblanc and Perdigon 2004; Narushima *et al.* 2010). Cependant mes superviseurs de stage ont mis en évidence en 2011 l'induction de la protéine anti-tumorale p27^{kip1} par l'inoculation de *S. thermophilus* à des rats axéniques (Lee and Kim 2009; Rul *et al.* 2011).

b) Enjeux cellulaires sur la barrière épithéliale

L'épithélium digestif présente plusieurs stratégies de défense résumées en figure 8 pour limiter la croissance, l'invasion et le contact avec la flore microbienne pathogène et commensale. Ce système de « barrière épithéliale » repose sur : une couche de mucus visqueuse et dense assurant une relative stérilité de la couche la plus proche des cellules, la sécrétion de peptides antimicrobiens (défensines), le système immunitaire en particulier par la synthèse d'IgA sécrétoires, un système de jonctions cellulaires assurant son imperméabilité. La rupture ou l'altération de la barrière épithéliale peuvent conduire à une perte de la tolérance orale et le déclenchement de pathologies inflammatoires intestinales (McGuckin *et al.* 2009). Les probiotiques dont *S. thermophilus* seraient capables d'impacter différents aspects de cette barrière épithéliale (Ohland and Macnaughton 2010).

(1) Défense antimicrobienne

Cette activité est stimulée par *S. thermophilus* par l'induction de la production d'IgA sécrétoires et de défensines, cet aspect a été détaillé dans la sous-partie « capacités anti-pathogènes ».

(2) Jonctions épithéliales

L'inflammation est souvent associée à une rupture des jonctions serrées qui ouvre le passage à des antigènes microbiens susceptibles de déclencher une libération de cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IFN γ , IL-1 β et IL-13). Cette rupture de jonctions serrées étant à la fois une cause potentielle et une conséquence de l'inflammation, son rôle dans le développement des MICI n'est pas encore clairement élucidé (Ohland and Macnaughton 2010). Expérimentalement, il a été montré sur des lignées cellulaires épithéliales intestinales que *S. thermophilus* et *L. acidophilus* étaient capables d'augmenter la résistance transépithéliale et de diminuer la perméabilité de la monocouche cellulaire à la condition que les bactéries soient biologiquement actives (Resta-Lenert and Barrett 2003). A l'échelle moléculaire, l'étude a montré une induction de la protéine transmembranaire occludine et de la protéine cytosolique ZO-1 impliquée dans l'ancrage des claudines (Structure en figure 9). En outre les voies de signalisation impliquaient une induction de la voie de plusieurs kinases (p38, ERK, PI3K, JNK). Enfin la même équipe a montré que le pré-

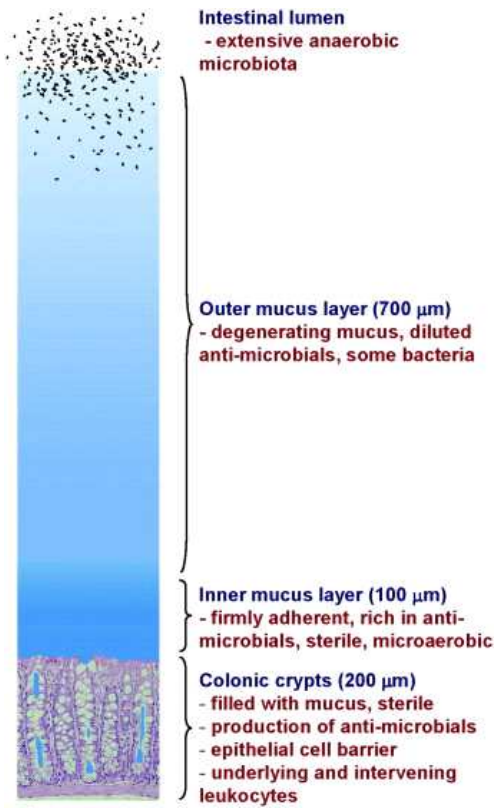


Figure 10 : Structure du mucus épithéliale colique en deux couches : une couche supérieure lâche et colonisée, et une couche inférieure dense et stérile. Tiré de (McGuckin, *et. al.* 2008).

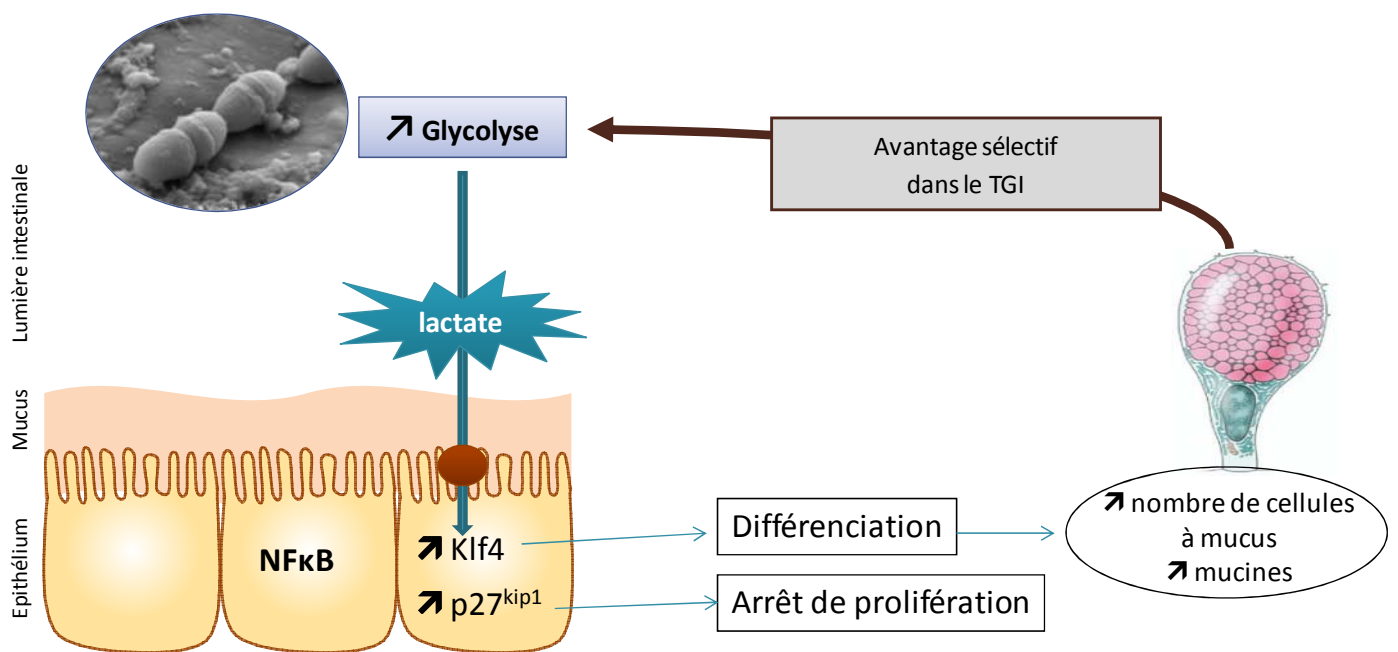


Figure 11 : Connaissances préliminaires des effets de *S. thermophilus* LMD-9 sur le TGI. Induction de la différenciation des cellules à mucus par le biais du lactate notamment. Induction des facteurs de différenciation et des protéines d'arrêt du cycle cellulaire. Le passage dans le TGI induit un processus d'adaptation qui sélectionne des bactéries dont une partie des protéines de la glycolyse est induite.

traitement de lignées cellulaires avec les deux bactéries suffisait pour induire un effet préventif diminuant l'altération de l'épithélium par les cytokines inflammatoires $IFN\gamma$ et $TNF\alpha$ (Resta-Lenert and Barrett 2006).

(3) Mucus

Le mucus est séparé en deux couches : une couche supérieure à mailles relâchées où le microbote réside et interagit avec les oligosaccharides et glycoprotéines du mucus ; et une couche inférieure plus dense et stérile (Phillipson *et al.* 2008) (figure 10). Dans l'épithélium intestinal, parmi les trois types cellulaires recensés, les cellules en gobelets sont responsables de la synthèse et de la glycosylation des mucines, des glycoprotéines hautement glycosylées (jusqu'à 80% de la masse totale). Les mucines confèrent une hydrophobicité et une cohésion structurale à la matrice de mucus (Lievin-Le Moal and Servin 2006).

Le mucus est une barrière qui révèle toute son importance dans la lutte contre les pathogènes et la modulation de l'inflammation lorsqu'elle est étudiée dans les modèles animaux de colite (Hansson 2012). L'altération de la fonctionnalité de Muc2, la mucine prédominante dans l'intestin grêle et le côlon, induit une augmentation de l'adhérence bactérienne, de la perméabilité de l'épithélium et donc une sensibilité accrue au développement de colites (Kim and Ho 2010). Il a été démontré qu'une colite était développée suite à l'inactivation des enzymes β -3-galactosyltransférases qui glycosylent les mucines, cette inactivation favorise parallèlement l'infiltration bactérienne dans l'épithélium (Fu *et al.* 2011). L'inactivation simultanée des gènes codant pour la mucine Muc2 et la cytokine anti-inflammatoire IL-10 induit aussi une colite (van der Sluis *et al.* 2008). Enfin, une étude sur biopsies humaines a révélé que les pathologies inflammatoires de l'intestin induisaient une diminution de la couche de mucus et du nombre de cellules en gobelets produisant et glycosylant le mucus notamment (Gersemann *et al.* 2009).

La régulation de la glycosylation et de la synthèse de mucus joue donc un rôle dans la prévention des pathologies inflammatoires et des infections. Les probiotiques comme promoteurs de la production de mucus ont ouvert une voie pour le renforcement de la barrière intestinale, les capacités de *S. thermophilus* dans ce sens ont été testées. Chez des souris à colite induite par acide acétique, l'inoculation de *S. thermophilus* a montré une augmentation de l'épaisseur de la couche de mucus. L'étude montre une diminution des cytokines pro-inflammatoires stimulées par la colite et une augmentation de l'IL-10 anti-inflammatoire (Rodriguez *et al.* 2010). Des résultats semblables sur les mêmes cytokines sont actuellement obtenus dans une étude encore en cours avec des souches de *L. bulgaricus* ou *S. thermophilus* isolées d'un yaourt sur lignées cellulaires et chez la souris (Del Carmen *et al.* 2012).

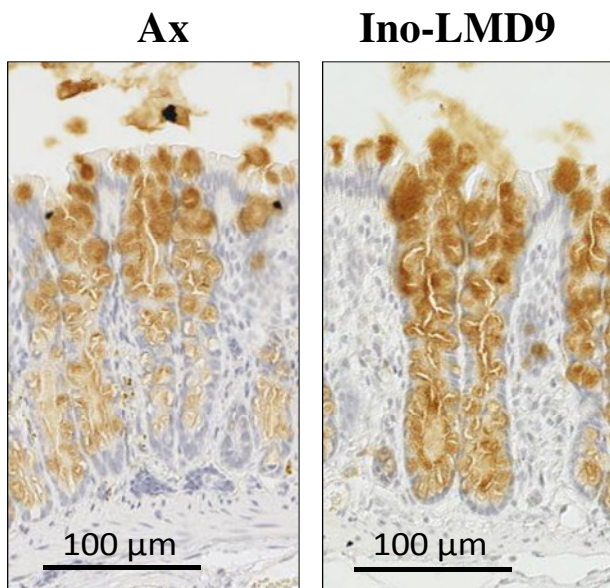


Figure 12 : Marquage par immunohistochimie de la protéine Mucine 2 (marron) sur des coupes de cryptes de côlon de rats axéniques (GF) ou inoculés avec *S. thermophilus* LMD-9 (Ino-LMD9). Les cellules totales ont été colorées à l'Hématoxyline. On observe une augmentation du nombre de cellules Muc2 positives dans les cryptes des animaux gnotoxéniques.

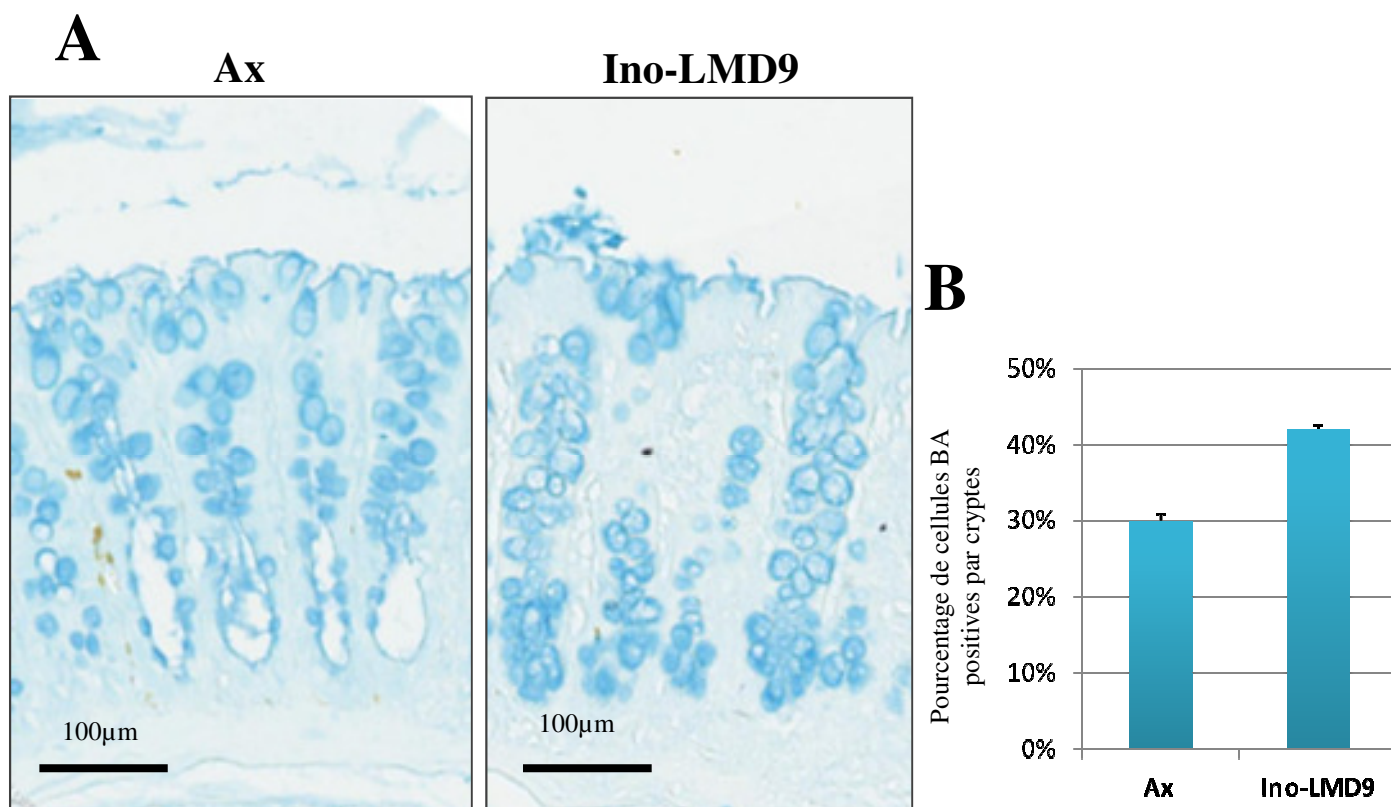


Figure 13 : Comptage des cellules à mucus dans les cryptes coliques. Des coupes de côlon de rats axéniques (Ax) ou inoculés avec *S. thermophilus* LMD-9 ont été colorées au bleu alcian qui marque les mucopolysaccharides acides (bleu).

A. Photographies représentatives des résultats obtenus en marquage au bleu alcian.

B. Comptage de la proportion de cellules positives au bleu alcian par crypte en fonction du statut des rats. Quarante cryptes ont été comptées chez deux rats de chaque catégorie.

On dénombre une plus grande proportion de cellules positives au bleu alcian (productrices de mucus) chez les rats gnotoxéniques par rapport aux axéniques.

Ces observations nous conduisent aujourd'hui à imaginer un effet inducteur sur la sécrétion de mucus qui pourrait être intéressant pour le traitement de maladies inflammatoires induites par un dysfonctionnement de la production de mucus.

III. Effets de *S. thermophilus* sur la différenciation du TGI

En 2010 mon laboratoire a démontré, en utilisant des animaux gnotobiotiques, que le microbiote était capable d'augmenter la taille des cryptes coliques en modifiant le ratio prolifération/différenciation de l'épithélium *via* les protéines du cycle cellulaire PCNA, Bcl2, p27^{kip1} et p21^{cip1} (Cherbuy *et al.* 2010). Au cours d'études préliminaires à mon arrivée, mes encadrants ont découvert les indices d'un effet de *S. thermophilus* LMD-9 sur la différenciation de l'épithélium colique. Cela a été montré en utilisant des animaux initialement axéniques et qui ont été inoculés avec une culture de *S. thermophilus*. En effet, cette bactérie, quand elle est présente seule dans le tractus digestif, induit la production de la protéine d'arrêt du cycle cellulaire p27^{kip1} ainsi que l'ARNm et la protéine du facteur de différenciation terminale Klf4 dans le côlon (Chegdani 2010; Rul *et al.* 2011). Les effets connus de *S. thermophilus* dans le TGI sont résumés en figure 11.

Plusieurs travaux encore en cours dans mon laboratoire d'accueil doivent être évoqués. Pour pouvoir vérifier cet effet « inducteur de la différenciation » engendré par *S. thermophilus*, des marquages d'immunohistochimie sur des protéines spécifiques des cellules en gobelets ont été réalisés par Laura Wrzosek en comparant des coupes de côlon de rats axéniques ou inoculés avec *S. thermophilus* LMD-9. En comparant la taille et le nombre de cellules à mucus dans les cryptes de l'épithélium, L. Wrzosek a mis en évidence une augmentation du nombre de cellules en gobelet sans modification de la taille des cryptes c'est-à-dire sans augmentation du nombre total de cellules (figure 12 & 13). La question s'est posée de savoir si cet effet de différenciation impactait la production et la composition du mucus. De plus W. Turpin a montré dans le laboratoire que la capacité d'adhésion de *S. thermophilus* aux cellules coliques est fortement induite dans le cas où les cellules produisent du mucus.

Dans ce contexte, l'objet de mon stage était d'étudier deux effets : la capacité de *S. thermophilus* à moduler la différenciation des cellules à mucus et l'impact de l'hôte sur le métabolisme des sucres de la bactérie. Une première phase de mon stage s'est déroulée sur un modèle animal gnotoxénique ne possédant dans son tractus gastro-intestinal (TGI) que la bactérie *S. thermophilus*. Je présenterai les études réalisées sur la réponse de l'hôte puis les altérations du métabolisme bactérien induites par le passage dans le TGI. La deuxième phase de mon stage s'est appuyé sur un modèle animal à flore conventionnelle qui présente un défaut de production de

Identifiant	Nom	Effet de LMD-9	Probabilité critique corrigée	Effet cellulaire	Interaction avec TNF α	Interaction avec TGF β	Publication associée
<i>Card2</i>	Kératine 8	32,4	0,0873	Protection intestinale Inhibition IBD	-	-	(Ku <i>et al.</i> 2010) (Owens and Lane 2004a; Owens <i>et al.</i> 2004b; Tao <i>et al.</i> 2007)
<i>Krt19</i>	Kératine 19	245,5	0,0873	Protection intestinale	-	-	
<i>IL10RB</i>	Sous-unité beta du récepteur à IL-10	10,5	0,0996	Inhibition NFkB Cytokines suppresseur	Inhibiteur	Induit	(Armstrong <i>et al.</i> 1996)
<i>Tnfrsf9</i>	Récepteur au TNF α 9/ Antigène IL-A des Lymphocytes T	11,7	0,1015	Régulation de la différenciation des Lymphocytes	Induit, Récepteur	-	(Teijeira <i>et al.</i> 2012)
<i>Tnip1</i>	TNF α interacting protein 1	30,2	0,1097	Inhibition NFkB Inhibition acide rétinoïque	Induit	-	(Gurevich <i>et al.</i> 2011)
<i>CHC</i>	Chaîne lourde de la Clathrine	28,2	0,0873	Induction NFkB et IL-8	Module les effets inflammatoires	-	(Escobar <i>et al.</i> 2006; Kim <i>et al.</i> 2011)
<i>Tgfb2</i>	Récepteur à TGF β	18,6	0,0566	Induction réponse T régulatrice		Récepteur Induit	(Marquet 2011)
<i>Casp1</i>	Caspase 1	13,2	0,1015	Apoptose Induction IL-1 β	Induit	-	(Siegmond 2002)
<i>Ing4</i>	Inhibiteur de facteur de croissance 4	12,0	0,0859	Arrêt du cycle cellulaire Apoptose Inhibiteur NFkB	Interaction	-	(Mathema and Koh 2012)
<i>UBD</i>	Ubiquitine D	35,5	0,0958	Inhibiteur d'apoptose	Induit, inhibiteur	-	(Ren <i>et al.</i> 2011)
<i>uPa</i>	Activateur de l'urokinase plasminogène	0,05	0,1015	Tumorigénèse Migration et prolifération	Induit	-	(Wilson and Gibson 2000; Dass <i>et al.</i> 2008; Shetty <i>et al.</i> 2012)

Tableau 2 : Gènes différentiellement exprimés dans les rats gnotoxéniques inoculés avec *S. thermophilus* (n=3) par rapport à des rats maintenus axéniques (n=3). Recensement des principaux gènes impliqués dans les processus de cycle cellulaire ou de la réponse inflammatoire. Les relations des gènes avec TNF α et TGF β sont précisés. Les résultats sont tirés de l'analyse transcriptomique réalisée par F. Chegdani durant sa thèse (Chegdani 2010), en rouge le gène est induit, en bleu il est réprimé.

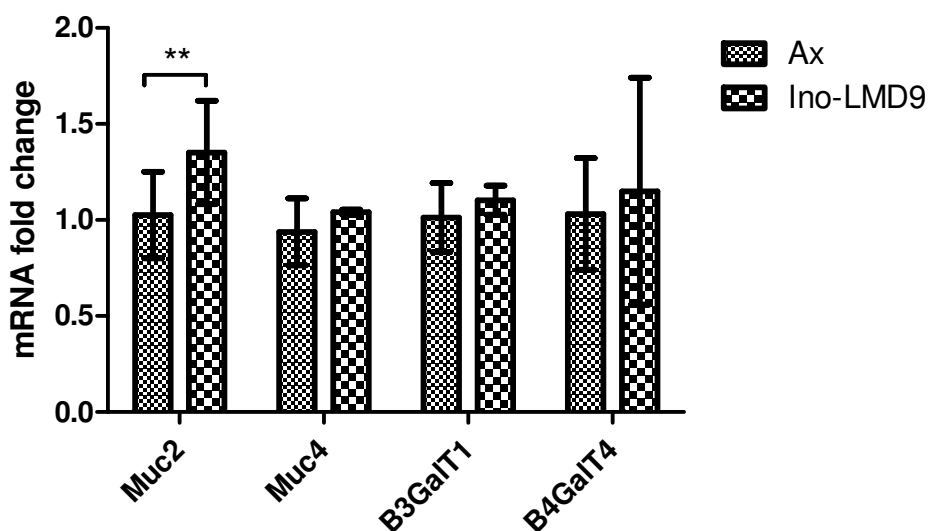


Figure 14 : Mesure de l'expression des gènes *Muc2*, *Muc4*, *β 3GalT1* et *β 4GalT4* dans le côlon de rats axéniques (Ax) ou inoculés avec *S. thermophilus* LMD-9 (Ino-LMD9). Quantification de la quantité d'ARNm par RT-qPCR chez les rats Ino-LMD9 (n=3) et Ax (n=3) ; les résultats représentent des moyennes normalisées \pm écart-type de trois répétitions 30 jours après inoculation de rats axéniques (n=3) par rapport à des rats maintenus axéniques (n=3). Tests statistiques de Student réalisés avec le logiciel GraphPad. Significativité pour p<0.005 (**).

mucus déclencheur d'une colite afin de tester les effets de *S. thermophilus* sur la modulation d'une réponse inflammatoire intestinale liée à la différenciation du mucus.

Résultats et Discussion

I. Effets de *S. thermophilus* sur la différenciation du TGI

A. Approche préliminaire

Une puce de transcriptomique a été réalisée sur les ARN des cellules du côlon de rats mono-associés avec *S. thermophilus* ; les données avaient été traitées statistiquement au cours de la thèse de Fatima Chegdani mais pas interprétées biologiquement (Chegdani 2010). Une modélisation mathématique des interactions connues entre les gènes induits différentiellement par l'inoculation de *S. thermophilus* a mis en évidence une induction globale des gènes liés aux voies de signalisation des facteurs TGF β et TNF α (Annexes 1 & 2). Au début de mon stage, j'ai donc travaillé sur le jeu de données qui était disponible au laboratoire. Je me suis ainsi particulièrement intéressé aux voies TGF β et TNF α , car les gènes codants pour les protéines Klf4 et p27^{kip1} sont eux-mêmes connus pour être des cibles de TGF β dans les processus de différenciation épithéliaux (Hartsough and Mulder 1997; Ravitz and Wenner 1997). Dans la voie TNF α , on trouve une induction des gènes impliqués dans les processus d'apoptose et la répression d'un gène inducteur de prolifération dans les cellules épithéliales. Les observations résumées dans le tableau 2 suggèrent un lien entre la différenciation des cellules à mucus et certaines voies de signalisation cellulaires. L'analyse des données transcriptomique ne permettant pas de conclure sur l'expression des composants du mucus, nous avons analysé directement l'expression des gènes liés au mucus par RT-qPCR.

Afin d'étudier la capacité de *S. thermophilus* à moduler la production colique de mucus, j'ai choisi d'étudier l'expression de deux gènes, *Muc2* et *Muc4*. *Muc2* est la principale mucine sécrétée et synthétisée par les cellules en gobelet, que ce soit chez l'Homme ou chez les rongeurs (Andrianifahanana *et al.* 2006). *Muc4* est une mucine exprimée dans le tractus gastro-intestinal mature. En effet cette mucine n'atteint son niveau d'expression maximale que plusieurs semaines après la naissance, en parallèle de la colonisation microbienne (Rong *et al.* 2005). De plus, même dans le tractus adulte, l'expression de *Muc4* n'est effective que dans les cellules en gobelet de la moitié supérieure de la crypte, c'est-à-dire pour les cellules qui ont atteint un degré avancé de différenciation (Jonckheere *et al.* 2007).

En plus des gènes codant les mucines, j'ai également étudié les deux gènes codant la β -1,4-galactosyltransférase (B4GalT) et la β -1,3-galactosyltransférase (B3GalT), des enzymes de glyco-

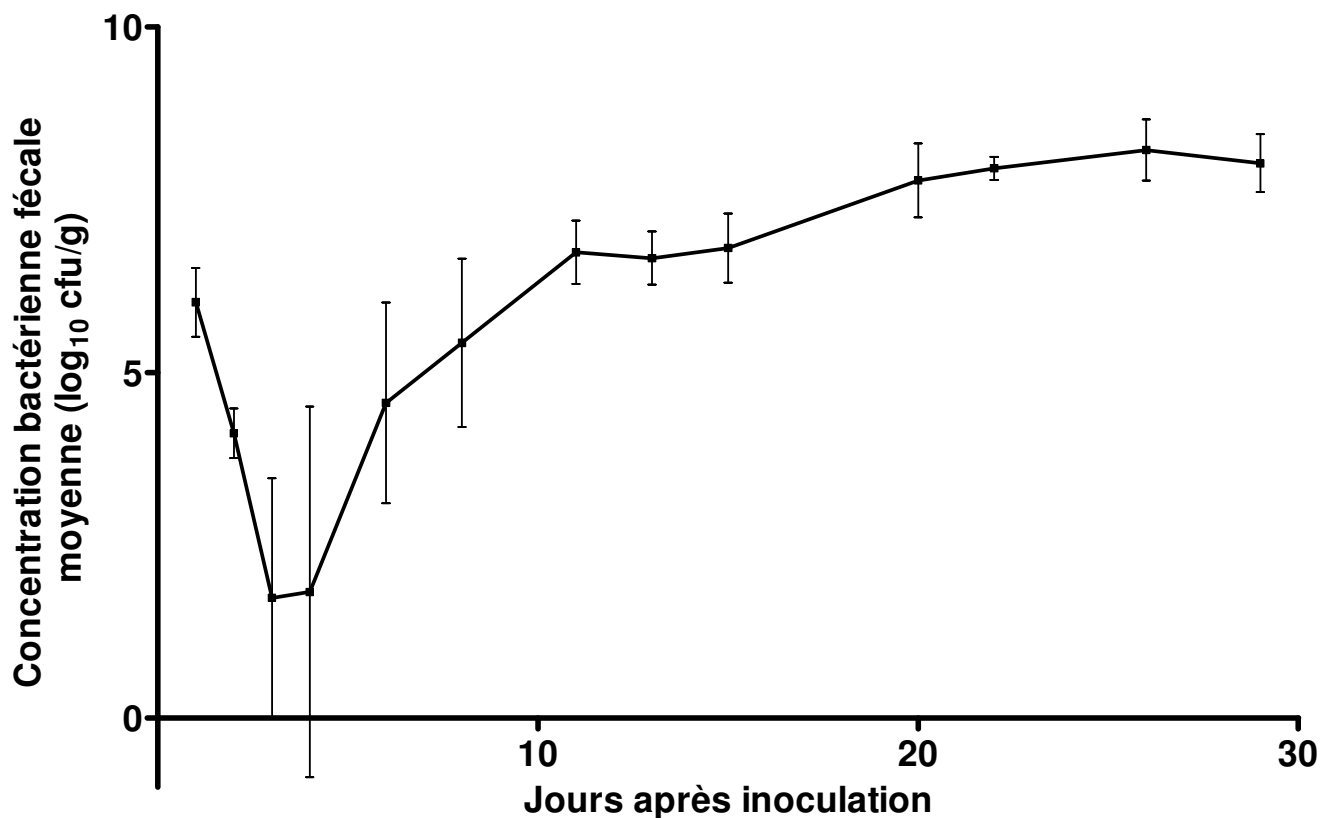
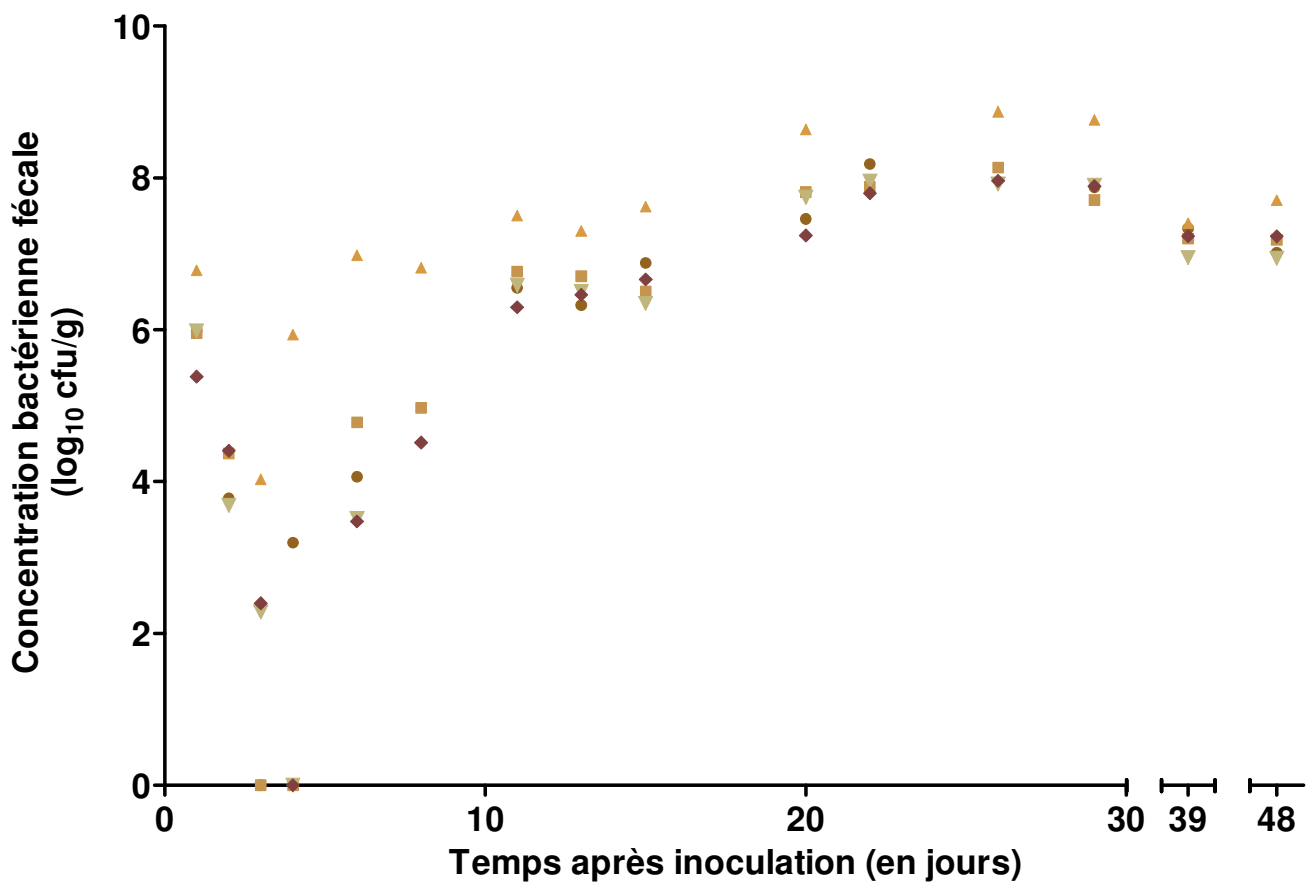


Figure 15 : Suivi de l'implantation par individu (en haut) ou moyenne (en bas) de *S. thermophilus* LMD-9 dans les fèces de cinq souris axéniques après une unique inoculation de $1,5 \cdot 10^8$ CFU (soit $8,2 \log_{10}$ CFU) au jour 0. Les dénombrements ont été réalisés par étalement de fèces à différentes dilutions sur M17 lactose 1% (m/v) ; les résultats sont donnés en \log_{10} CFU/g fèces. La limite inférieure de sensibilité étant de $2 \log_{10}$ CFU/g fèces.

sylation des mucines, un processus influençant les propriétés rhéologiques et viscoélastiques du mucus (Gendler and Spicer 1995). L'activité et l'expression de B4GalT a été comparée chez des souris axéniques et conventionnelles. L'étude a montré qu'aucune différence n'était remarquable chez de jeunes souris ; cependant chez les adultes l'activité enzymatique et la quantité d'ARNm étaient considérablement réduits chez les axéniques par rapport aux conventionnelles. Ces deux paramètres pouvaient cependant être corrigés par l'inoculation d'une flore conventionnelle prélevée de souris préalablement sevrées (Nanthakumar *et al.* 2005).

B. Résultats & Discussion

Les résultats de l'analyse de RT-qPCR sont présentés dans la figure 14. *S. thermophilus* LMD-9 induit l'expression de *Muc2* suggérant une induction de la production de mucus *via* l'induction potentielle du nombre de cellules productrices de mucus. L'expression des deux enzymes de glycosylation n'a elle non plus pas été significativement modifiée. L'observation des données et notamment les écarts-types obtenus montrent la forte hétérogénéité d'expression entre les animaux : il serait intéressant de répéter ces expériences sur davantage d'animaux. Il est important de noter que les analyses ont été faites sur un seul peptide de chacune des galactosyltransférases qui en comptent 7 pour B4GalT et 6 pour B3GalT. Ainsi, il serait pertinent de chercher à évaluer l'activité galactosyltransférase de toute la muqueuse afin de prendre en compte l'holoenzyme entière et davantage d'étapes de modulation de l'expression.

C. Expériences complémentaires

Ce projet a été prolongé par un partenariat établi avec l'équipe de Catherine Robbe du laboratoire de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle pour l'analyse fine de la composition biochimique d'échantillons de mucus colique de souris mono-associées avec *S. thermophilus* LMD-9.

Pour identifier les messagers du dialogue entre *S. thermophilus* et la différenciation du mucus dans le TGI nous avons posé l'hypothèse que le lactate (principal métabolite de *S. thermophilus*) pouvait être impliqué. En effet, des études préliminaires proposent un rôle prépondérant du lactate dans l'effet de *S. thermophilus* sur l'hôte (Rul *et al.* 2011). J'ai réalisé des incubations de lactate avec la lignée cellulaire colique HT29-MTX productrice de mucus afin d'étudier l'influence du métabolite bactérien sur la différenciation des cellules. Nous proposons de mesurer l'expression génétique et protéique des facteurs de différenciation déjà mis en évidence *in vivo* : Klf4, p21^{kip1}, p27^{kip1} et des mucines Muc2 et Muc4. Afin d'observer l'influence du métabolite sur les différents stades de différenciation des cellules, j'ai réalisé ces incubations à 7, 14, 21 et 28 jours après ensemencement. Les incubations ont pris fin très récemment et les dosages restent à faire.

	Sucre cible	Gène	Enzyme codée	Action	Génomique	Protéine détectable	Enzyme fonctionnelle
Monosaccharides	Glucose	ψ ptsG	Glucose PTS	Transport	Pseudogène	Non	Non
		glcK	Glucose-kinase	Dégradation	Gène fonctionnel	Oui	-
		celB	Cellobiose PTS orphan-IIC	Transport	Gène fonctionnel	-	-
	Fructose	ψ fruR fruB ψ fruA	Fructose PTS	Transport	Pseudogène	Non	Non
		fruB	Fructose-1-phosphate kinase	Dégradation	Gène fonctionnel	Oui	-
	Galactose	galK	Galactokinase	Transport	Gène fonctionnel	Oui	Faible
galM, K, T, E1		Voie de Leloir	Dégradation	Gène fonctionnel	galKTE1 Induits (TGI)	Oui	
Disaccharides	Lactose	ψ treR ψ treP ψ treA	Trehalose PTS	Transport	Pseudogène	Non	Non
		LacS	Lactose perméase	Transport	Gène fonctionnel	Induite (TGI)	Oui
	Saccharose	LacZ	β -galactosidase	Dégradation	Gène fonctionnel	Oui	Oui
		ψ scrR scrA scrK ptsK et ptsIH	Sucrose PTS	Transport	Pseudogène	scrA, scrK et ptsIH	Non
		scrB	Sucrose-6-phosphate hydrolase	Dégradation	Gène fonctionnel	Induite (TGI)	-
		ψ sacB	Levansucrase	Dégradation	Pseudogène	Non	Non
Polysaccharides	Glycanes	ψ dexT	Dextranase	Dégradation	Pseudogène	Non	Non
		ψ pulA	Amylopullulanase		Pseudogène	Non	Non
	Amidon	amyL	Amylase		Gène fonctionnel	Oui	-
Glycogène	glgP, malQ	Glycogen phosphorylase	Gène exprimé	Induite (TGI)	-	-	
Composites	β -glucosides	bgIP	β -glucoside PTS	Transport	Pseudogène	Non	Non
	Ribose/Glucose	Stu/str0855	Ribose/glucose porter (GRP)		Gène fonctionnel	-	-
	Maltose	malQ malR ψ	Maltose/Maltodextrine ABC transporter		Pseudogène	malQ	Non
		malE ψ malF			Pseudogène	Non	Non
	Glucose	Stu/str0809-811 ou SBP, NBP, MSP	Sugar ABC transporter		Gène fonctionnel	SBP, NBP	-
	Mannose	manMNL	Mannose, Fructose, Glucose (manMNL) PTS transporter		Gène fonctionnel	manNL	Non
	Fructose						-
Glucose	Non						

Table 3 : Liste des gènes impliqués dans le métabolisme des sources carbonées potentielles pour *S. thermophilus*. La présence d'un gène fonctionnel, d'une protéine exprimée et de la fonctionnalité de l'enzyme ont été testés. ψ désigne un pseudogène, « - » désigne une absence d'information. Extrait de (Bolotin, *et al* 2004 ; Goh, *et al* 2011) pour la génomique, (Salzano, *et al* 2007) pour la protéomique, (Van den Bogaard, *et al* 2004) pour la fonctionnalité, (Rul, *et al* 2011) pour l'induction dans le TGI.

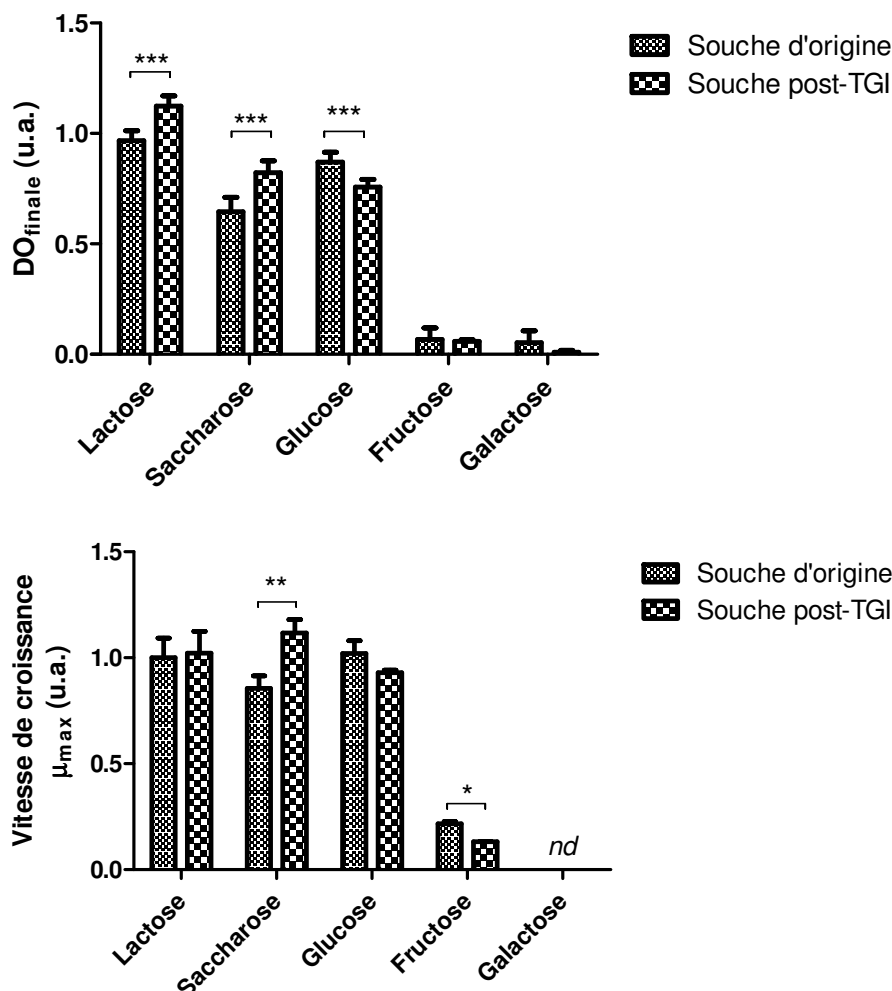


Figure 16 : Densité optique de fin de culture (en haut) et vitesse de croissance relative (en bas) de *S. thermophilus* LMD-9 en présence de différents substrats carbonés avant (souche d'origine) et après (souche post-TGI) implantation dans le tractus gastro-intestinal (TGI) de souris. Les densités optiques (DO) ont été mesurées sur plaque *in vitro*. La vitesse maximale de croissance des bactéries a été rapportée à la valeur de croissance de la souche d'origine en présence de lactose. Les valeurs de DO ont été retranchées de celles de témoin de milieux M17 ensemencés. Pour la souche d'origine les moyennes de DO sont les résultats de trois répétitions de trois cultures indépendantes. Pour la souche post-TGI, les moyennes de DO sont les résultats de trois répétitions de fèces issus de trois souris gnotoxéniques différentes, 29 jours après inoculation. Tests statistiques de Student réalisés avec le logiciel R : significatif pour $p < 0.05$ (*), $p < 0.005$ (**), $p < 0.0005$ (***)

II. Influence du TGI sur le métabolisme de *S. thermophilus*

S. thermophilus induit différentes étapes clés de la voie du mucus (Klf4, le nombre de cellules à mucus et l'ARNm de Muc2) de l'épithélium colique. Il a été montré que le passage dans le TGI induisait une modification protéomique des bactéries notamment en induisant les protéines de la glycolyse (Rul *et al.* 2011). Pour mieux étudier les relations entre une bactérie et l'intestin, nous avons déterminé si le passage de *S. thermophilus* dans le TGI pouvait changer le métabolisme carboné de la bactérie. Pour cela nous avons comparé les capacités *S. thermophilus* avant et après passage dans le TGI à utiliser différentes sources de carbone *in vitro*. Connaissant l'avantage sélectif majeur que confère la capacité de dégradation du mucus dans le TGI pour les bactéries commensales et commensales (Koropatkin *et al.* 2012) nous avons tenu à étudier les capacités de *S. thermophilus* à dégrader les sucres simples mais également les sucres plus complexes constitutifs du mucus.

Pour cela, j'ai obtenu des souris mono-associées avec *S. thermophilus* et j'ai suivi l'implantation chez la souris gnotoxénique de *S. thermophilus* à partir de fèces pendant 30 jours. Le même profil d'implantation a été retrouvé chez les cinq souris, il se présente en trois phases : une première phase de chute de la population la première semaine, une phase d'augmentation la deuxième semaine puis un plateau atteint à partir de la troisième semaine d'implantation (figure 15). Ce profil est comparable à celui retrouvé chez le rat (Rul *et al.* 2011; Thomas *et al.* 2011). La phase d'augmentation de la concentration bactérienne peut être interprétée comme le résultat de la colonisation d'un ou plusieurs individus sélectionnés sur de meilleures capacités d'implantation dans le TGI. Nous avons souhaité identifier les caractères concernés par cet avantage et avons proposé une modification du métabolisme carboné vers une diversification des substrats que la bactérie est potentiellement capable de dégrader (gène fonctionnel ou protéine détectée) ou bien vers une amélioration du métabolisme de sources déjà consommées. Les gènes impliqués dans le métabolisme carboné retrouvés chez *S. thermophilus* sont répertoriés dans le tableau 3.

Les capacités de métabolisation de onze sucres par la souche LMD-9 avant et après implantation dans le TGI ont été testées par suivi de la croissance bactérienne en milieu M17 : ces sucres sont soit habituellement consommés par au moins certaines des souches de *S. thermophilus* (lactose, saccharose, glucose, fructose, galactose), soit retrouvés dans le mucus (N-acétylgalactosamine, N-acétylglucosamine, fucose) et/ou dans l'aliment végétal des animaux (cellobiose, arabinose, xylose, saccharose). Les densités optiques (DO) de fin de culture en présence de chacun des cinq premiers sucres cités ont été comparées au témoin sans source carbonée afin de déterminer si la souche était capable de les utiliser. Seuls les sucres lactose, saccharose, glucose

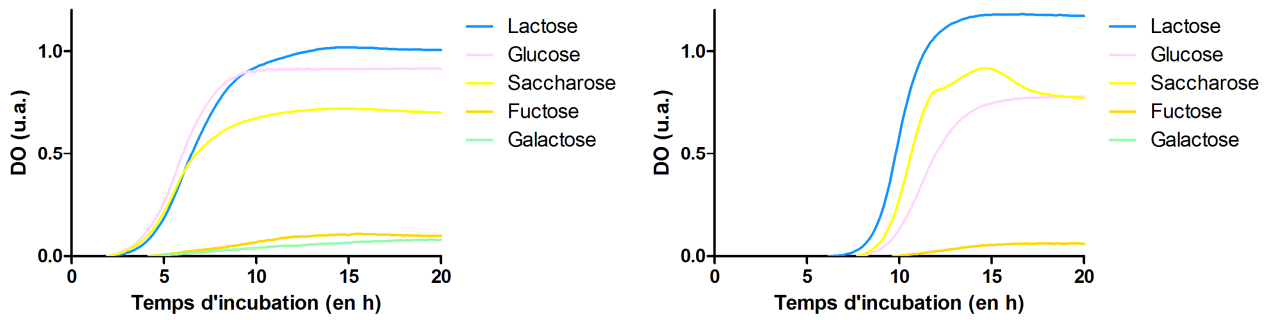


Figure 17 : Courbes de croissance d'un échantillon représentatif de *S. thermophilus* LMD-9 en présence de différents substrats carbonés avant (à gauche) et après (à droite) implantation dans le TGI de souris. Les valeurs de DO ont été retranchées de celles de témoin de milieux M17 ensemencés.

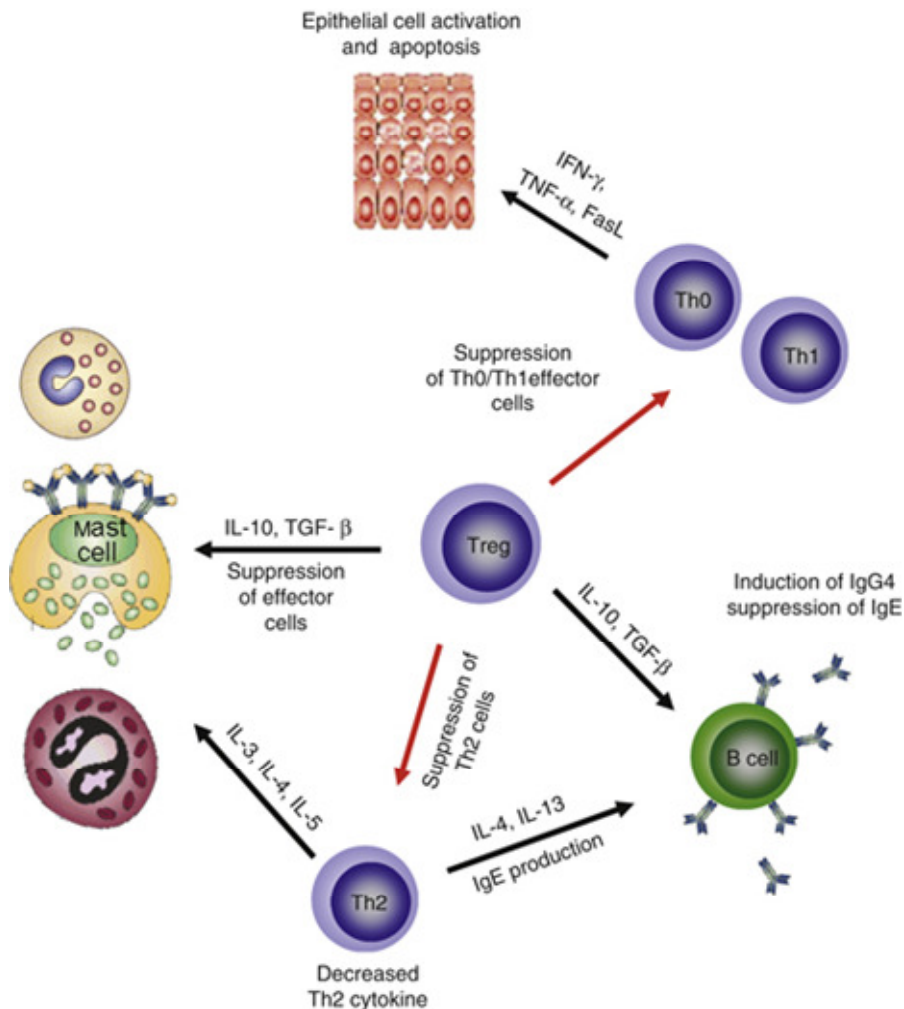


Figure 18 : Rôle de TGFβ et IL-10 dans la réponse T régulatrice. TGFβ et IL-10 sont impliqués dans la suppression des mastocytes effecteurs et des lymphocytes B qui produisent l'IgE. Les lymphocytes T régulateurs diminuent les réponses inflammatoires en supprimant les cellules effectrices de la réponses Th0 et Th1 et en supprimant les cellules Th2. Tiré de (Ozdemir, *et al* 2009).

ont entraîné une modification de DO, les deux autres substrats ne sont donc pas ou très peu métabolisés par la souche avant ou après le passage dans le TGI (figure 16).

Pour ces sucres plus efficacement métabolisés (lactose, glucose, saccharose), le passage de la souche LMD-9 dans le TGI a peu d'influence sur sa vitesse de croissance hormis pour le saccharose qui permet une meilleure croissance après passage dans le TGI qu'avant passage. En présence du fructose peu métabolisé, la souche issue du TGI présente une croissance plus faible. Le deuxième critère observable est la quantité totale de bactéries formées par la culture de chacune des souches pour une même quantité de substrat, c'est-à-dire *l'efficacité à métaboliser le substrat* : on mesure cette valeur par la DO de fin de culture. La souche extraite du TGI métabolise plus efficacement que la souche originale les disaccharides lactose et saccharose mais moins efficacement le glucose. En présence de fructose, les DO finales ne sont pas significativement différentes. Il est enfin remarquable que la souche issue du TGI a systématiquement un temps de latence supérieur d'environ 5h à la souche LMD-9 originale (figure 17).

Ces résultats suggèrent une amélioration de la capacité à dégrader les disaccharides ce qui laisse penser à une induction du métabolisme de dégradation de ces sucres dans le TGI. Cette modification pourrait s'opérer au moment de la phase d'adaptation et sélectionner les bactéries les plus aptes à survivre sur des critères d'optimisation du métabolisme. Il est important de remarquer que le saccharose dont le métabolisme est induit dans nos deux critères de mesure, est un sucre présent dans l'aliment des souris ; il serait vraisemblable que l'optimisation spécifique du métabolisme de ce sucre rencontré quotidiennement pourrait induire un avantage majeur pour des variants bactériens. Il serait intéressant de répéter ces expériences en présence d'autres sucres complexes tels que le glycogène ou plus particulièrement l'amidon aussi présent dans l'aliment. Des études conduites sur l'implantation de *Escherichia coli* dans des animaux mono-associés ont montré que la capacité à produire des variants, en particulier touchant le métabolisme, est augmentée dans le TGI et confère un avantage pour la survie de l'espèce (Giraud *et al.* 2008; Alpert *et al.* 2009). Dans nos expériences, afin d'identifier le facteur responsable de l'optimisation du métabolisme, il serait intéressant de chercher des mutations ponctuelles communes dans le génome des souches adaptée au TGI. Il pourrait aussi être utile de tester ces hypothèse sur le transcriptome ou le protéome de la bactérie. Avant de recourir aux méthodes à haut-débit, nous sommes actuellement en train de tester les propriétés de réimplantation dans le TGI des souches isolées de fèces afin de vérifier leur avantage à l'implantation. Cette expérience s'est terminée récemment, les bactéries présentes dans les fèces restent à être dénombrées.

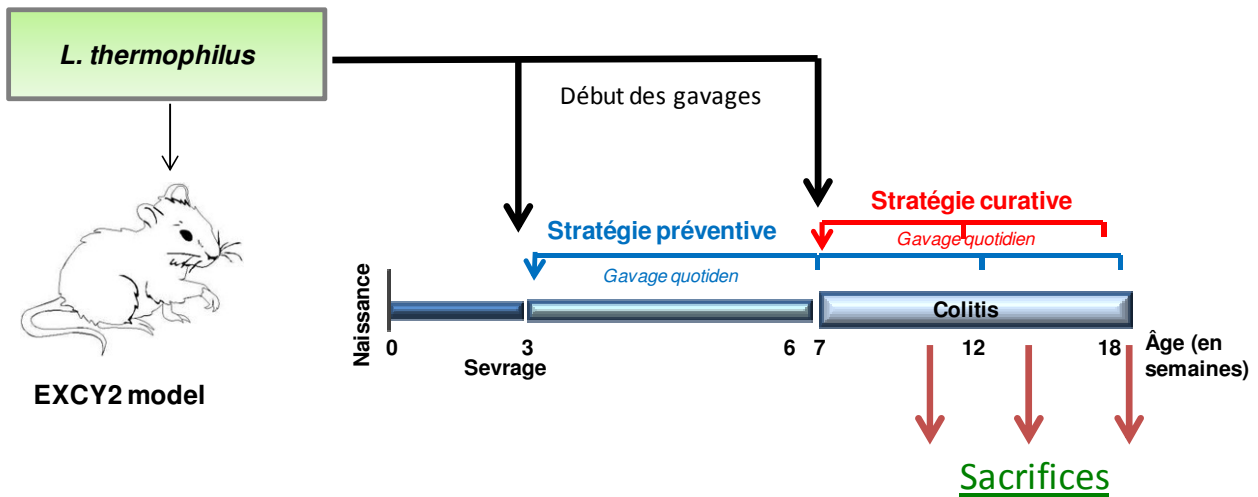


Figure 19 : Protocole opératoire prévu pour les expériences de gavage de modèles de souris EXCY2 avec *S. thermophilus* LMD-9 kana^R résistant à la kanamycine. Deux stratégies sont développées : une stratégie *préventive* de gavage avant le déclenchement de la colite et une stratégie *curative* au début du déclenchement de la colite. Les animaux sont gavés quotidiennement avec une culture en lait de *S. thermophilus* (n=9) ou de lait stérile (n=3). Le sacrifice a lieu à différents temps après le début du gavage pour prélèvements et analyses.

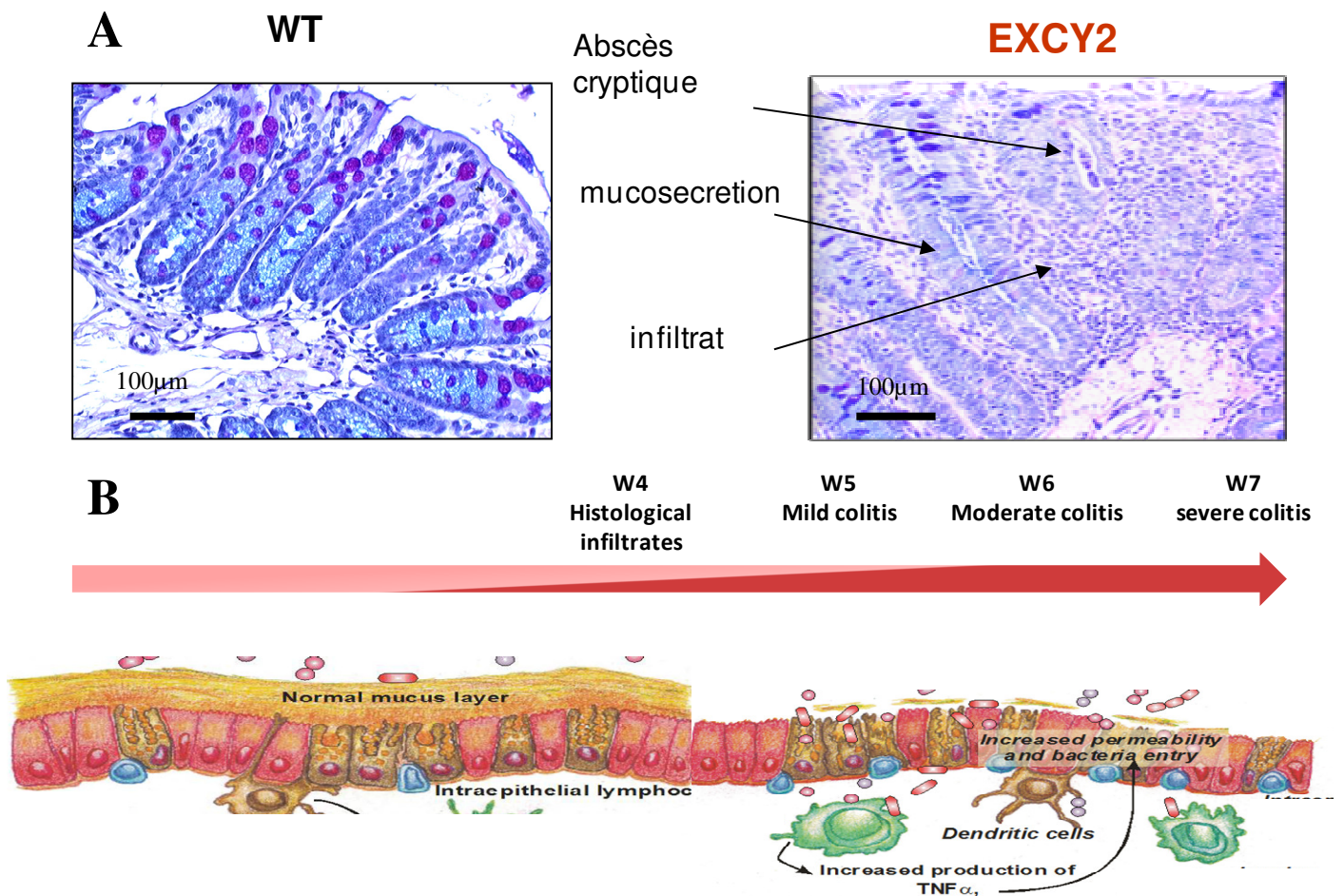


Figure 20 : Epithélium colique des souris EXCY2.

A. Coupes de muqueuse colique de souris sauvages ou EXCY2 observée au microscope optique. On observe chez les souris EXCY2 une infiltration bactérienne et un abcès cryptique.

B. Modélisation : les souris présentent une déficience dans la production de mucus qui induit une colite en six à sept semaines. La colite s'accompagne d'une levée de la barrière épithéliale et d'une infiltration bactérienne qui induit la réponse inflammatoire. Données extraites de (Ogier-Denis 2012b).

III. Effet de *S. thermophilus* sur l'inflammation déclenchée par un défaut de mucus

La bibliographie suggère des effets anti-inflammatoires de *S. thermophilus* via la production de l'IL-10 suppressive de cytokines inflammatoires et la répression de la réponse pro-inflammatoire Th17 chez des souris à colite induite (Rodriguez *et al.* 2010; Ogita *et al.* 2011). Une induction de la réponse T régulatrice par l'augmentation des lymphocytes T régulateurs ainsi que l'induction de la production de TGF β , la cytokine orientant vers cette réponse, sont aussi observées (Donkor *et al.* 2012) (figure 18). Je me suis intéressé aux effecteurs de la réponse immunitaire différentiellement exprimés lors de l'analyse transcriptomique de F. Chegdani. J'ai été intéressé par une induction de plusieurs gènes codant pour des effecteurs de la réponse inflammatoires et interagissant notamment avec les voies TNF α et TGF β comme résumé dans le tableau 2.

La stimulation de la production de mucus par *S. thermophilus* associée à une induction d'effecteurs potentiellement anti-inflammatoires et garants de l'intégrité épithéliale nous a amené à proposer un effet bénéfique de *S. thermophilus* sur les MICI (voir sous-partie Mucus). Nous avons proposé pour cela de travailler sur un modèle de colite induite développé par l'équipe de Dr Eric Ogier-Denis (INSERM, Hôpital Bichat, Paris) par l'inactivation de deux gènes induisant un défaut de production de mucus et une augmentation de la probabilité d'infiltration bactérienne. Cette colite présente l'intérêt de se développer progressivement en plusieurs semaines et ainsi de permettre de tester des traitements avant ou après le déclenchement spontané de l'inflammation (Ogier-Denis 2012a) (figure 19) ce qui présente un avantage intéressant vis-à-vis des autres modèles à colite induite notamment chimiquement (Jurjus *et al.* 2004).

Le modèle animal de souris EXCY2 développé par le Dr Ogier-Denis (figure 20) développe progressivement en six à sept semaines de vie une inflammation du côlon de type rectocolite hémorragique. Les symptômes des souris sont semblables à la rectocolite hémorragique humaine cliniquement (inflammation continue du rectum au côlon proximal, saignements, diarrhées, prolapsus, perte de poids, diminution du rapport longueur sur poids du côlon), histologiquement (infiltration bactérienne, cryptites, ulcération, perte de cellules à mucus, prolifération), et moléculairement (cytokines proinflammatoires augmentées : IL-17, TNF α , IL-1 β , IL-13, IL-6, IFN γ).

Bien que gaver quotidiennement les souris avec la bactérie *S. thermophilus* nous assurait sa présence dans le TGI, au moins en transit, nous avons souhaité pouvoir suivre son implantation dans un TGI hébergeant une flore conventionnelle. Pour cela nous avons introduit un gène de résistance à la kanamycine dans le chromosome de la souche LMD-9 pour pouvoir la dénombrier sélectivement par rapport à l'ensemble des autres bactéries du microbiote intestinal. Pour éviter de perturber le comportement, les capacités d'implantation ou une séquence régulatrice de l'expression de *S. thermophilus* tout en nous assurant de l'expression du gène de résistance, j'ai

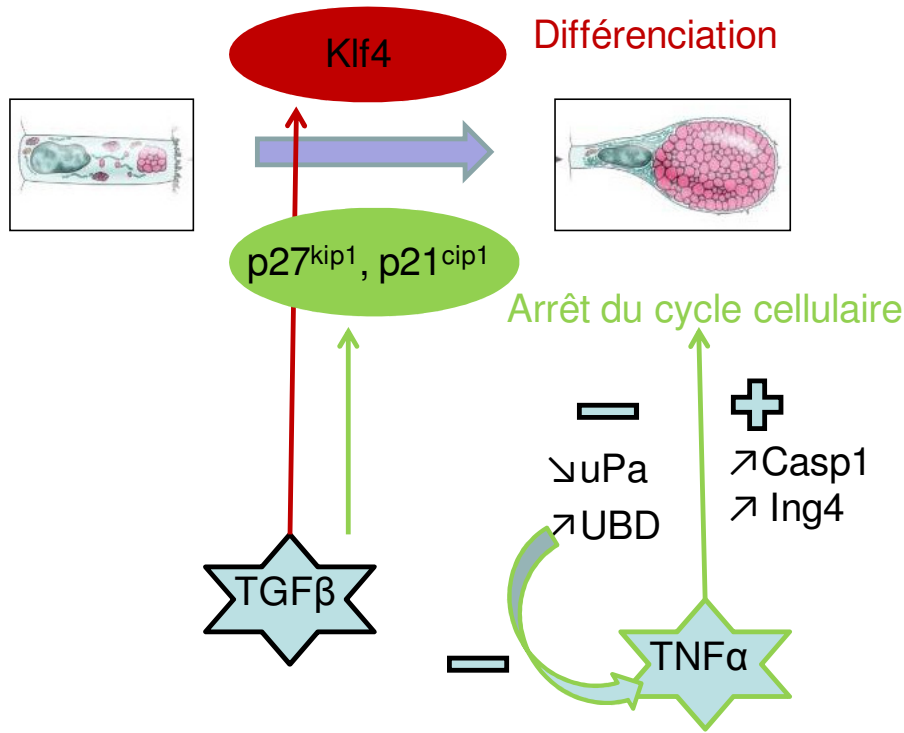


Figure 21 : représentation schématique des effecteurs supposés impliqués dans les processus de différenciation et d'arrêt du cycle cellulaire des cellules en goblets de l'épithélium colique. TGFβ est inducteur des protéines d'arrêt du cycle cellulaire et du facteur de différenciation Klf4. TNFα interagit avec plusieurs facteurs apoptotiques induits par *S. thermophilus* LMD-9 dans le TGI de rats. Les gènes nommés ici sont recensés avec leurs fonctions dans le tableau 4.

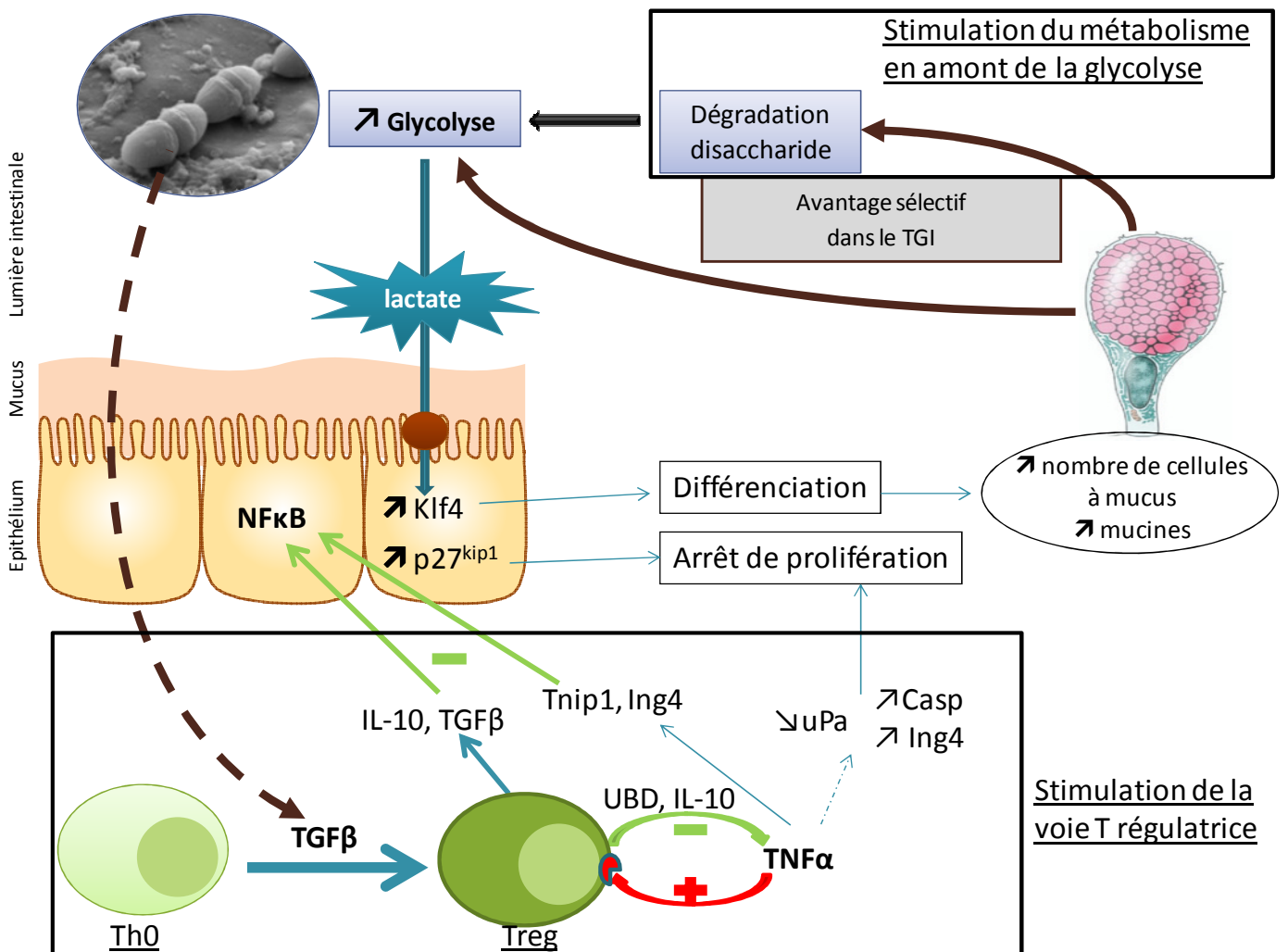


Figure 22 : Hypothèse des voies empruntées et sollicitées par *S. thermophilus* LMD-9 dans le TGI. Les voies et facteurs identifiés au cours de mon stage sont encadrés en noir. Le facteur TGFβ induit la voie T régulatrice qui elle-même induit des facteurs inhibiteurs de NFκB et des signaux d'arrêt de prolifération par TNFα. L'optimisation du métabolisme des disaccharides peut conférer un avantage sélectif nécessaire à la survie et à l'implantation dans le TGI. Les gènes nommés ici sont recensés avec leur fonction dans le tableau 4.

introduit la séquence dans un pseudogène codant pour une transposase tronquée *ster_0152*. Après m'être assuré de la résistance à l'antibiotique de la souche recombinante (LMD-9 *kana*^R) et de sa stabilité sur plusieurs centaines de générations, j'ai vérifié que les profils de croissance dans le lait et en milieu de culture étaient similaires à ceux de la souche sauvage.

Les fèces ont été prélevées quotidiennement pour suivre l'implantation de la souche LMD-9 *kana*^R. Nous projetons après euthanasie des animaux, de prélever le côlon pour doser les protéines et les ARNm des effecteurs de la réponse immunitaire (IL-10, IL-8, NFκB) et de la différenciation, notamment des cellules à mucus (Klf4, Muc2, p27^{kip1}, p21^{cip1}), puis de poursuivre ces études par de marquages histo- et immunohisto- et de la mucosécrétion (Bleu Alcyan, PAS, Muc2, Tff3). Des examens de la perméabilité épithéliale ainsi que des observations de microscopie électronique sont aussi prévus. Les expériences étant encore en cours, les résultats ne sont pas encore connus.

Conclusion

Au cours de ce stage l'emploi d'un modèle animal à flore contrôlée m'a permis d'étudier les effets de la bactérie *S. thermophilus* seule dans le tractus digestif. Les travaux conduits dans mon laboratoire d'accueil ayant mis en évidence l'implication de cette bactérie dans des procédés de différenciation et de fin de prolifération, j'ai proposé l'intervention de deux facteurs cellulaires majeurs : TNFα pour la voie antiproliférative et TGFβ pour la voie de différenciation (figure 21). Je pense qu'il serait intéressant de développer un sujet sur des aspects immuno-modulateurs de *S. thermophilus* dont l'effet actuellement peu étudié semble confirmé par plusieurs publications récentes sur des propriétés anti-inflammatoires (Rodriguez *et al.* 2010; Ogita *et al.* 2011; Donkor *et al.* 2012). En montrant l'induction de l'expression de la mucine 2, j'ai confirmé les résultats du laboratoire sur l'effet inducteur de *S. thermophilus* sur les cellules à mucus sans pouvoir le généraliser aux autres composants du mucus ou à ses enzymes d'altération. Je me suis ensuite intéressé à l'effet de l'implantation gastro-intestinale sur le métabolisme bactérien et j'ai mis en évidence un métabolisme des disaccharides augmenté chez les bactéries issues du TGI. En interprétant la longue phase adaptative préliminaire à l'augmentation de la population comme une étape de sélection de variants bactériens, le boost du métabolisme des disaccharides apparaît comme un caractère important pour la survie dans le TGI. Dans le TGI, l'induction par *S. thermophilus* de plusieurs facteurs contrôlés par les voies TNFα et TGFβ a mis en évidence un réseau de signaux anti-inflammatoires connus pour leur action sur les cytokines pro-inflammatoires et la voie NFκB (figure 21). Ces observations associées à l'induction de la production de mucus nous ont conduits à développer un protocole d'inoculation de *S. thermophilus* dans un modèle d'inflammation inti-

mement lié à la production de mucus. Pour cela j'ai créé un mutant de *S. thermophilus* résistant à un antibiotique afin de pouvoir le détecter dans les fèces des animaux gavés avec cette bactérie.

Désormais pour donner un sens à ces effets nous devons les vérifier dans un modèle plus proche de ce qui est rencontré dans la nature en présence d'un microbiote complexe. L'utilisation du modèle monoxénique nous a permis d'identifier les effets principaux induits par *S. thermophilus* afin de choisir le modèle le plus pertinent pour son étude. Peu de travaux s'intéressent actuellement aux effets exclusifs de l'implantation d'une seule bactérie que ce soit sur l'hôte (Leimena *et al.* 2012) ou sur la bactérie elle-même (Giraud *et al.* 2008; Alpert *et al.* 2009). La tendance actuelle va plutôt vers des écosystèmes plus proches de la réalité mais moins maîtrisés qui doivent prendre en compte des réseaux d'interactions complexes et souvent encore inconnus (Marchesi 2011). Les progrès technologiques en matière d'analyses génomiques à haut débit ouvrent tout juste la porte à une identification exhaustive des espèces bactériennes présentes dans le TGI (Qin *et al.* 2010) qui met surtout en avant les limites de nos connaissances actuelles et les progrès qu'il nous reste à accomplir avant de pouvoir décrypter les lois qui régissent ce microbiome.

Matériel et Méthodes

I. Souches et conditions de culture bactérienne

La souche LMD-9 de *Streptococcus thermophilus* (ATCC BAA-491, USA) a été utilisée. Elle est issue des stocks conservés à -80°C en M17 (Difco, ref.218561) supplémentés de 0,5% (m/v) de lactose (VWR VDH Prolabo, GPR Rectapur Ref.24945.291) et 10% (v/v) de glycérol (équipe ComBac, UMR 1319 Micalis, Jouy-en-Josas). Les cultures ont été réalisées en milieu M17 avec 1% (m/v) de lactose à 37°C et les dénombrements déduits d'étalements de dilutions des cultures sur M17 agar (Difco ref.214530) lactose 1% (m/v) en conditions d'anaérobiose (Anaerocult A, Merck). Pour le gavage des rats, la souche LMD-9 a été cultivée en lait Nilac (NIZO, Ede, Pays-Bas) à 42°C jusqu'à atteindre un pH de 5,5 (correspondant à environ 5.10^8 CFU/mL) à partir de stocks congelés à -80°C réalisés en lait.

II. Conditions d'expérimentation animale

Les expérimentations animales ont été conduites dans le respect des directives françaises et européennes de soin et d'utilisation des animaux de laboratoire (permission 78-123 accordée à M. Thomas). Des souris femelles Balb/C axéniques d'une part et des rats mâles Fisher 344 d'autre part, tous âgés de 2 mois, ont été gavés oralement par une culture de *S. thermophilus* LMD-9 dans du lait Nilac reconstitué (environ 5.10^8 CFU/mL) à hauteur de 300µL par souris et 1mL par rat.

Cinq souris ont été gavées avec la culture de *S. thermophilus* LMD-9 tandis que cinq autres ont été gavées avec du lait Nilac stérile non ensemencé (groupe témoin) ; les 10 animaux ont été sacrifiés 52 jours après gavage. Quatre rats ont été inoculés avec la culture de *S. thermophilus* LMD-9 tandis que trois autres ont été inoculés avec du lait Nilac stérile non ensemencé (groupe témoin) ; les 7 animaux ont été sacrifiés 29 jours après gavage. Tous les animaux ont été élevés dans des isolateurs stérile (plateforme ANAXEM, Micalis, Jouy-en-Josas) et nourris par un aliment commercial (U.A.R, Villemoisson/Orge, France, ref. R03-40) stérilisé par irradiation à 45kGy. La composition biochimique de l'aliment est disponible dans (Dubos-Ramaré and Corthier 1990). La concentration bactérienne fécale a été déterminée deux fois par semaine jusqu'au sacrifice. Laura Wrzosek et Muriel Thomas ont réalisé les expérimentations sur rats.

III. Croissance de *S. thermophilus* LMD-9 en présence de différents sucres

La souche *S. thermophilus* LMD-9 issue des stocks (**souche d'origine**) a été incubée puis repiquée deux fois (8h, 37°C) dans un milieu M17 Lactose 1% (m/v) puis rincée au M17 (2 x 5000g, 5min) et reprise dans le même milieu de manière à atteindre une densité optique (DO) de 2 à 600nm (Kontron Instruments, Uvikon 931). La souche issue du TGI (**souche post-TGI**) a été isolée de fèces d'animaux gnotoxéniques, 29 jours après gavage, et remise en suspension dans du M17 à raison de $4,5 \cdot 10^5$ CFU/mL. Après centrifugation (500g, 5min), 10 μ L de chacune des suspensions ont été ensemencés dans 240 μ L de milieu M17 + sucre à 1% : lactose monohydrate, D(+)glucose, D(+)saccharose (VWR BDH Prolabo, ref.24945291, ref.24370.294, ref.27478.296), D-galactose (BD, ref.216310), ou D(-)fructose (Sigma, F-3510). Les cultures ont été réalisées à 37°C pendant 48h en plaque UV-star 96 puits (Grenier Bio-One, ref.655806) et suivie par enregistrement automatique de la DO_{600nm} sur Infinite M200 (Tecan Group Ltd.). La vitesse de croissance μ_{max} a été définie comme la pente de la courbe de ln(DO) au cours de la phase de croissance exponentielle. Les expériences ont été répétées trois fois indépendamment à partir de trois échantillons différents.

IV. Culture de lignée cellulaire et incubation avec du lactate

La lignée cellulaire HT29-MTX utilisée pour ces expériences a été fournie par T. Lessuffleur (INSERM UMR S 938, Paris, France) et a été utilisée au 52^{ème} passage. Cette lignée issue d'un carcinome colique a subi un traitement au méthotrexate conduisant à une sélection de cellules productrices de mucus comme décrit dans (Lessuffleur *et al.* 1990). Les cellules ont été cultivées en milieu « Dulbecco's modified Eagles's minimal essential medium » (DMEM) avec 4,5g/L de glucose, supplémenté avec 10% (v/v) de sérum fœtal de veau inactivé une heure à 56°C et 1% (v/v) de L-glutamine (200mM), et 100u/mL d'un mélange équivalent de pénicilline-

streptomycine (Lonza, BE12-733F ; ref.DE14-801F ; ref.BE17-605E ; ref.DE17-602E). Des monocouches de cette lignée cellulaire ont été préparées dans des boîtes de culture cellulaire 60mm (TPP, ref.93060). Les cellules ont été récupérées à 7, 14, 21 et 28 jours après repiquage. Quarante-huit heures avant le grattage, les antibiotiques sont retirés du milieu. Dix-huit heures avant le grattage, les cellules sont incubées dans du DMEM supplémenté avec 5% (v/v) de sérum foetal de veau et 20mM de L-(-)-Acide Lactique (Sigma, ref.L6402-10G) à un pH ramené à celui du milieu de culture. Les incubations utilisées comme des témoins sont réalisées sans lactate. Toutes les cultures ont été réalisées à 37°C en atmosphère régulée à 10% de CO₂:90% d'air. Les milieux de culture ont été changés quotidiennement. L'expérience a été réalisée une fois avec trois répétitions internes pour toutes les conditions.

V. Extraction des cellules, protéines et ARN du côlon

Lors du sacrifice, les animaux ont été anesthésiés sous isoflurane et le côlon entier a été prélevé. Les cellules ont été immédiatement récupérées soit après perfusion du côlon (modèle rat), soit après retournement du côlon et agitation mécanique douce (modèle souris), pendant 20min avec un tampon oxygéné à 37°C et contenant de l'EDTA pour décoller les cellules (NaCl 4,8 M, KCl 188 mM, KH₂PO₄ 48 mM, Na₂SO₄ 48 mM, NaHCO₃ 1 M, Hepes 400 mM, EDTA 10 mM, DTT, Albumine 10 %) comme décrit par (Cherbuy *et al.* 1995). Les protéines ont été extraites selon le protocole décrit par Cherbuy *et al.* (Cherbuy *et al.* 2010): après lavage en PBS (Eurobio, ref.CS1PBS01-01), les cellules ont été lysées 1h à 4°C dans un tampon Tris/HCl (10mM, pH 7,4) contenant 20mM de NaCl, 5mM de MgCl₂ 0,5% de Triton X100 et des inhibiteurs de protéase (AEBSF 0,4mg.mL⁻¹, EDTA-Na₂ 5mg.mL⁻¹, pepstatine 1mg.mL⁻¹) (Roche, France). Au cours de la lyse, les cellules ont été homogénéisées deux fois avec une seringue de calibre 26. Les cellules ont enfin été centrifugées (10000g, 4°C, 20min), le surnageant a été prélevé, aliquoté et conservé à -80°C avant analyses. Les protéines ont été dosées selon la méthode colorimétrique de Lowry avec de la BSA (Sigma cell culture, ref.A8551) (Lowry *et al.* 1951). Les ARN totaux ont été extraits dans une solution de phénol-chloroforme puis précipités dans l'isopropanol selon la méthode de Chomczynski (Chomczynski and Sacchi 1987).

VI. Dosage des ARN_m et mesure de l'expression des gènes par RT-qPCR chez le rat

La concentration et la pureté des ARN ont été estimées sur NanoDrop ND-100 (ThermoScientific ref.G926) par mesure de l'absorbance à 260nm, calcul du ratio A_{260}/A_{280} et du RNA Integrity Number (RIN) par le bioanalyser Agilent 2100 avec le kit RNA 6000 nano labChip (Agilent technologies, ref.G2938C) ; la qualité des ARN est jugée suffisante pour des ratios $A_{260}/A_{280}>1,8$ et des RIN>9 (Plateforme ICE, INRA Jouy-en-Josas). 7µg d'ARN a été prélevé pour une étape de

reverse transcription (RT) par utilisation du kit high-capacity cDNA archive (Applied Biosystems, France). L'étape de PCR quantitative en temps réel a été réalisée sur environ 2ng d'ADN complémentaires (ADNc) dilués à 10^{-2} sur ABI PRISM 7000 Sequence Detection System en utilisant des sondes TaqMan® ref Rn01475265_m1, Rn01455817_m1 et Rn01439430_m1 respectivement pour l'expression des gènes *Muc4* (Mucin 4), *C1GALT1* (core 1 synthase, glycoprotein-N-acetylgalactosamine 3-beta-galactosyltransferase 1) et *B4GalT4* (UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 4) (Applied Biosystems, France). Le gène *ARNr18S* (ref Hs99999901_s1, Applied Biosystems, France) a été employé comme gène de référence pour normaliser les mesures d'expression.

Des tests de détection d'inhibiteurs de polymérase ont été conduits avec le kit TaqMan Exogenous Internal Positive Control Reagents (Applied Biosystems, France, ref 4308323,). Les échantillons comparés ont été analysés simultanément sur la même plaque pour chaque gène ciblé. Trois dépôts des ADNc de trois rats axéniques (Ax) et de quatre rats gnotoxéniques (Ino-LMD9) ont été comparés pour chaque gène. Le calcul utilisé pour déduire la variation de l'expression génétique induite par la gnotoxénie a été $2^{-\Delta\Delta Ct}$ où $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{gène cible}} - Ct_{\text{ARNr18S}})_{\text{gnotoxénie}} - (Ct_{\text{gène cible}} - Ct_{\text{ARNr18S}})_{\text{axénie}}$ (Livak and Schmittgen 2001).

VII. Extraction des ARN des cultures cellulaires

Sous hotte stérile, le milieu d'incubation avec et sans L-lactate a été éliminé des boîtes de culture de cellules. Les tapis cellulaires ont été rincés deux fois avec 2mL de PBS stérile puis 500µL de tampon de lyse RNAprotect® (Qiagen, ref.76526) a été ajouté et laissé 1min avant de gratter les tapis cellulaires. Les cellules récupérées ont été conservées trois semaines à -80°C. Les cellules ont été fractionnées par TissueLyserII® (Qiagen, ref.85300) (2x45s, 30Hz) dans du phénol à pH 4 avec des billes de zirconium (Precellys24, diamètre 1.4mm, ref.03961-1-103). Après centrifugation (13000rpm, 7min, T°A) la phase aqueuse a été récupérée et laissée à incuber (5min, T°A) dans du TRIzol® Reagent (Invitrogen, ref.15596-026) puis supplémentée en chloroforme (3min, T°A) après une agitation vigoureuse. La phase aqueuse a été récupérée (13000rpm, 15min, T°A), précipitée dans l'isopropanol (13000rpm, 10min, T°A), rincée à l'éthanol 70% puis resuspendue dans de l'eau DEPC stérile. Les échantillons ont été stockés à -80°C.

VIII. Construction du mutant *S. thermophilus* délété pour le pseudogène *ster_0152* par insertion d'une cassette contenant un gène de résistance à la kanamycine

La cassette contenant le gène de résistance à la kanamycine du plasmide pKa (Debarbouille *et al.* 1990) a été amplifiée par PCR en utilisant l'ADN polymérase Phusion (Fermentas, ref.F530L)

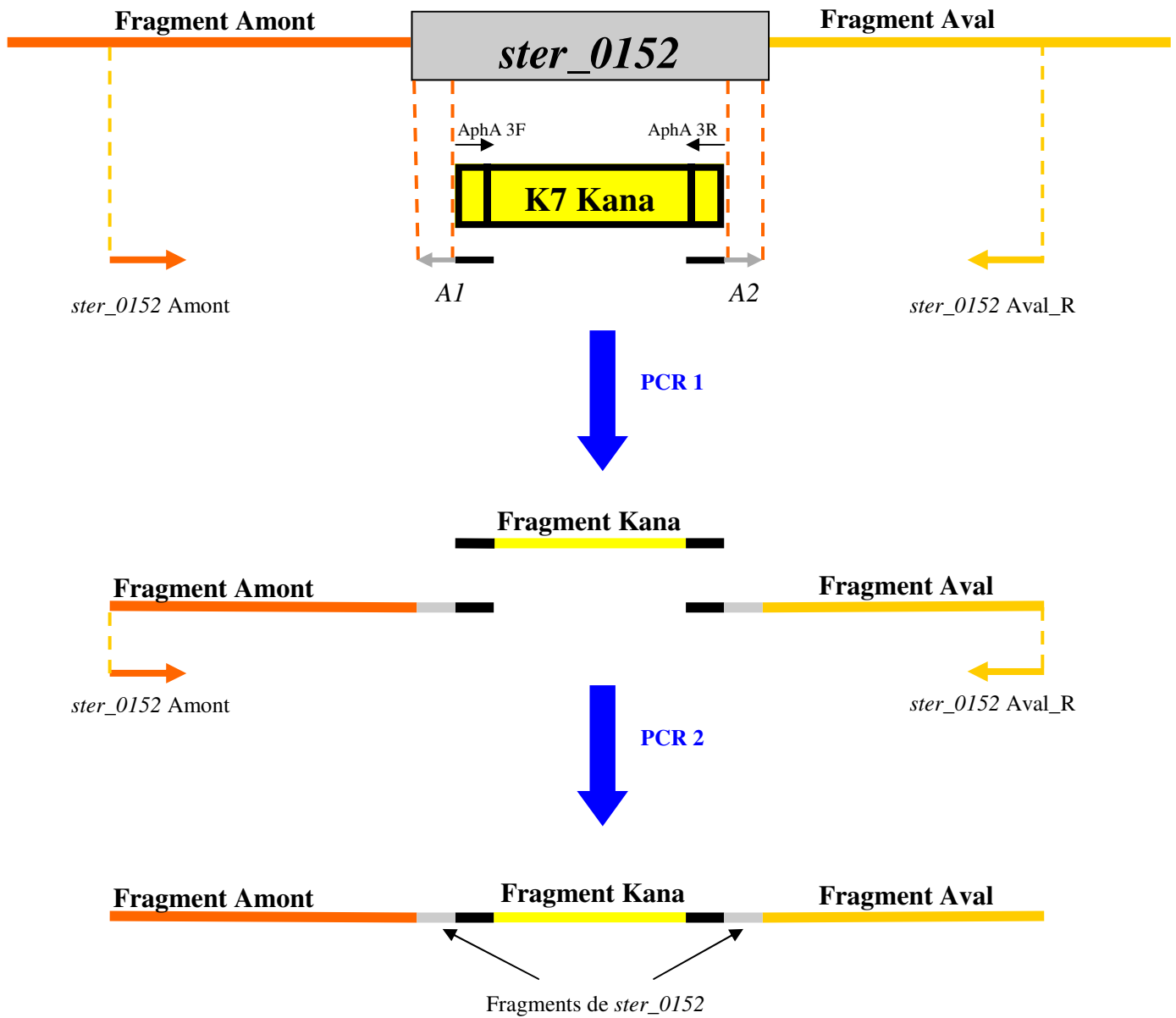


Figure 23 : Interruption du gène *ster_0152* chez *S. thermophilus* LMD-9

avec les amorces *AphA 3F* (5'CCAGCGAACCATTT GAG3') et *AphA 3R* (5'GTTGCGGATGT ACTTCAG3'). Deux nouvelles amorces ont été construites à partir de la séquence du pseudogène *ster_0152* dans le génome de *S. thermophilus* LMD-9 : une amorce *A1* regroupant les séquences en amont de la cassette (5'CTTACCTATCACCTCAAATGGTTCGCTGGGTTTATC3') et du pseudogène (5'TTAAAATGATTTATCG TC3'), et une amorce *A2* regroupant les séquences en aval de la cassette (5'AGGGGTCCCGAGCGCC TACGAGGAATTTGTATCGAT3') et du pseudogène (5'GGGACAGAACATTGTACC3'). On a ainsi obtenu deux amorces dont les extrémités 3' s'hybrident avec les extrémités 5' (sur les brins sens et antisens) de la cassette kanamycine qui a été amplifiée par PCR avec l'ADN polymérase Phusion pour donner le fragment **Kana**. Les mêmes amorces *A1* et *A2* ont été utilisées pour amplifier des fragments **Amont** et **Aval** d'ADN génomique LMD-9 avec une amorce *ster_0152 Amont* située environ 1kb en amont (5'CATCCATTAAGACGCCCC3') sur le brin antisens ou une amorce *ster_0152 Aval_R* située en aval (5'GGACAGCCGTAAACTATC3') sur le brin sens du pseudogène. Chacun de ces trois fragments **Amont**, **Kana** et **Aval** ont été mis en présence des deux amorces *ster_0152 Amont* et *ster_0152Aval_R* pour une ultime PCR avec l'ADN polymérase Phusion afin d'amplifier le fragment **Insert** présentant de chaque côté de la cassette kanamycine des séquences de 1kb s'hybridant avec les séquences du chromosome de la souche LMD-9. Après purification avec le kit Wizard® (Promega, ref.A9281), 1µg de l'**Insert** a été incubé 2h à 42°C avec la souche LMD-9 cultivée en un milieu minimal chimiquement défini MCD fabriqué sur place (Letort and Juillard 2001) après induction de la compétence naturelle comme décrit par Gardan *et al.* (Gardan *et al.* 2009). Les bactéries transformées recombinantes, i.e. pour lesquelles le gène *ster_0152* a été remplacé par la cassette kanamycine, ont été ensuite sélectionnées par étalement sur M17 agar lactose 1% (m/v) avec 1‰ (m/v) de kanamycine (Sigma, ref.K-4000). Elles ont ensuite été vérifiées par PCR en présence d'amorces spécifiques de la cassette kanamycine et des fragments *Amont* et *Aval*. Les similitudes physiologiques de la souche obtenue avec la souche LMD-9 d'origine ont été vérifiées par suivi de la croissance en milieu M17 avec 1% (m/v) de lactose (mesure de la DO_{600nm}, cf ci-dessus) et en lait Nilac reconstitué (NIZO, Ede, Pays-Bas).

IX. Analyses statistiques

Les comparaisons des groupes de données entre différents lots d'animaux ont été réalisées par une étude de variance ANOVA à un seul facteur suivie d'un test de Student. La différence entre deux échantillons est considérée significative pour une probabilité critique « p » inférieure à 0,05. Les analyses statistiques ont été conduites sur le logiciel R (R version 2.10.0, R Development

Core Team (2009)) avec le package Rcmdr (John Fox, *et al.* R package version 1.5-3 (2009)) ou sur le logiciel GraphPad (GraphPad Prism version 5.04 pour Windows).

Références bibliographiques

- Ait-Belgnaoui, A., W. Han, et al. (2006). "*Lactobacillus farciminis* treatment suppresses stress induced visceral hypersensitivity: a possible action through interaction with epithelial cell cytoskeleton contraction." *Gut* **55**(8): 1090-4.
- Alpert, C., J. Scheel, et al. (2009). "Adaptation of protein expression by *Escherichia coli* in the gastrointestinal tract of gnotobiotic mice." *Environ Microbiol* **11**(4): 751-61.
- Andrianifahanana, M., N. Moniaux, et al. (2006). "Regulation of mucin expression: mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases." *Biochim Biophys Acta* **1765**(2): 189-222.
- Barbut, F. and J. L. Meynard (2002). "Managing antibiotic associated diarrhoea." *BMJ* **324**(7350): 1345-6.
- Ben-Yahia, L. (2012). Etude du dialogue hôte/bactéries lactiques du ayourt chez des rats gnotobiotiques. *Microbiologie*. Jouy-en-Josas, AgroParisTech. **PhD**: 146.
- Bolotin, A., B. Quinquis, et al. (2004). "Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*." *Nat Biotechnol* **22**(12): 1554-8.
- Bouchard, D., L. Rault, et al. (2012). *Lactobacillus casei* CIRM 667 inhibe l'adhésion et l'internalisation aux cellules épithéliales mammaires de souches de *S. aureus* isolées de mammites. Club des Bactéries Lactiques, Clermont-Ferrand.
- Boyanova, L., M. Stephanova-Kondratenko, et al. (2009). "Anti-*Helicobacter pylori* activity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains: preliminary report." *Letts Appl Microbiol* **48**(5): 579-84.
- Boyle, P. and J. Ferlay (2005). "Cancer incidence and mortality in Europe, 2004." *Ann Oncol* **16**(3): 481-8.
- Bryce, J., C. Boschi-Pinto, et al. (2005). "WHO estimates of the causes of death in children." *Lancet* **365**(9465): 1147-52.
- Canani, R. B., P. Cirillo, et al. (2007). "Probiotics for treatment of acute diarrhoea in children: randomised clinical trial of five different preparations." *BMJ* **335**(7615): 340.
- Carroll, I. M., J. M. Andrus, et al. (2007). "Anti-inflammatory properties of *Lactobacillus gasseri* expressing manganese superoxide dismutase using the interleukin 10-deficient mouse model of colitis." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **293**(4): G729-38.
- Chain, F., N. Kechaou, et al. (2012). *Identification de nouvelles souches probiotiques aux effets anti-oxydants*. Club des Bactéries Lactiques, Clermont-Ferrand.
- Challenges. (2010). "Danone retire sa demande de validation de l'Activia et l'Actimel." Retrieved 02/06/2012, 2012, from <http://www.challenges.fr/entreprise/20100415.CHA8275/danone-retire-sa-demande-de-validation-de-l-activia-et-l-actimel.html>.
- Chegdani, F. (2010). Effects of *Streptococcus thermophilus* bacteria on rat gene expression profiles. *Sistema agro-alimentare*. Piacenza, Università Cattolica del Sacro Cuore. **PhD**: 180.
- Cherbuy, C., H. Blottière, et al. (2004). Flore intestinale et épithélium colique. *Flore microbienne intestinale, Physiologie et pathologie digestives*. L. E. John. Paris, John Libbey Eurotext.
- Cherbuy, C., B. Darcy-Vrillon, et al. (1995). "Effect of germfree state on the capacities of isolated rat colonocytes to metabolize n-butyrate, glucose, and glutamine." *Gastroenterology* **109**(6): 1890-9.
- Cherbuy, C., E. Honvo-Houeto, et al. (2010). "Microbiota matures colonic epithelium through a coordinated induction of cell cycle-related proteins in gnotobiotic rat." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **299**(2): G348-57.

- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-9.
- Commission, G. E. (1998). The Complete German Commission E Monographs, Therapeutic Guide to Herbal Medicines. Integrative Medicine Communications. Bk&CD-Rom.
- Coudeyras, S. and C. Forestier (2010). "[Microbiota and probiotics: effects on human health]." Can J Microbiol **56**(8): 611-50.
- de Moreno de Leblanc, A. and G. Perdigon (2004). "Yogurt feeding inhibits promotion and progression of experimental colorectal cancer." Med Sci Monit **10**(4): BR96-104.
- De Simone, C., B. Bianchi Salvadori, et al. (1986). "The adjuvant effect of yogurt on production of gamma interferon by con A-stimulated human peripheral blood lymphocytes." Nutrition reports international **33**(3): 14.
- Debarbouille, M., M. Arnaud, et al. (1990). "The sacT gene regulating the sacPA operon in *Bacillus subtilis* shares strong homology with transcriptional antiterminators." J Bacteriol **172**(7): 3966-73.
- Del Carmen, S., P. Langella, et al. (2012). Sélection de souches anti-inflammatoires de bactéries lactiques isolées d'un yaourt Argentin. Club des Bactéries Lactiques. Clermont-Ferrand.
- Delorme, C., C. Bartholini, et al. (2011). "Complete genome sequence of the pigmented *Streptococcus thermophilus* strain JIM8232." J Bacteriol **193**(19): 5581-2.
- Denef, J. (1996). Cours d'histologie de l'appareil digestif. Cours d'histologie de l'appareil digestif. Faculté de médecine de l'Université Catholique de Louvain.
- Donkor, O. N., M. Ravikumar, et al. (2012). "Cytokine profile and induction of T helper type 17 and regulatory T cells by human peripheral mononuclear cells after microbial exposure." Clin Exp Immunol **167**(2): 282-95.
- Drider, D., K. Naghmouchi, et al. (2012). Quel avenir pour les bactériocines ? Club des Bactéries Lactiques. Clermont-Ferrand.
- Dubos-Ramaré, F. and G. Corthier (1990). "Short Communication: Influence of Dietary Proteins on Production of *Clostridium difficile* Toxins in Gnotobiotic Mice." Microbial Ecology in Health and Disease **3**(4): 3.
- Dubuisson, C., S. La Vieille, et al. (2002). Allergies alimentaires : état des lieux et propositions d'orientations, Afssa Derns.
- Ducluzeau, R. and P. Raibaud (1979). Ecologie microbienne du tube digestif. Actualités scientifiques de l'INRA. Elsevier-Masson. Paris.
- Duggan, A. (2002). "*Helicobacter pylori*: when is treatment now indicated?" Intern Med J **32**(9-10): 465-9.
- EFSA (2006). "Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) related to the safety in use of nisin as a food additive in an additional category of liquid eggs " EFSA journal.
- EFSA (2007). "Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA." EFSA Journal **5**77: 16.
- EFSA (2010a). "Scientific opinion on lactose threshold in lactose intolerance and galactosaemia." EFSA journal **8**(9): 29.
- EFSA (2010b). "Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to live yoghurt cultures and improved lactose digestion." EFSA journal **8**(10): 18.
- Eren, M., E. C. Dinleyici, et al. (2010). "Clinical efficacy comparison of *Saccharomyces boulardii* and yogurt fluid in acute non-bloody diarrhea in children: a randomized, controlled, open label study." Am J Trop Med Hyg **82**(3): 488-91.
- Falk, P. G., L. V. Hooper, et al. (1998). "Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology." Microbiol Mol Biol Rev **62**(4): 1157-70.

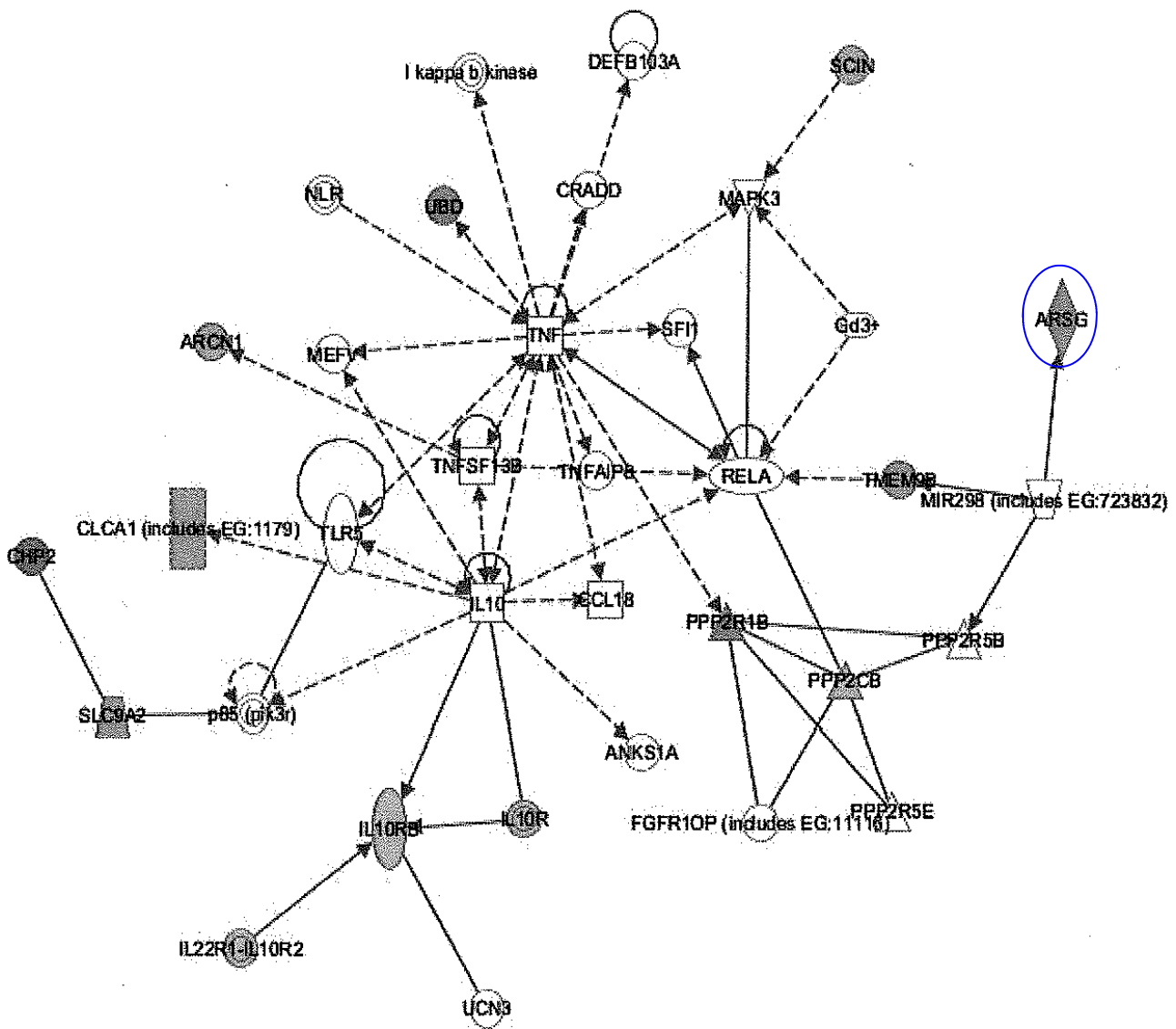
- FAO/OMS (2001). Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. F. a. A. O. o. t. U. N. W. H. Organization. Cordoba, Argentina.
- FDA (2002). "GRN No.49 *Bifidobacterium lactis* strain Bb12 and *Streptococcus thermophilus* strain Th4 " GRAS Notice inventory.
- FDA (2012). "GRN No.378 Cultured [dairy sources, sugars, wheat, malt, and fruit- and vegetable-based sources] fermented by [*Streptococcus thermophilus*, *Bacillus coagulans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus bulgaricus* and *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* or mixtures of these strains] " GRAS Notice Inventory.
- Freund, J. (2000). Bases fondamentales...en biologie. Héptao-Gastro. **7**: 47-56.
- Fu, J., B. Wei, et al. (2011). "Loss of intestinal core 1-derived O-glycans causes spontaneous colitis in mice." J Clin Invest **121**(4): 1657-66.
- Gardan, R., C. Besset, et al. (2009). "The oligopeptide transport system is essential for the development of natural competence in *Streptococcus thermophilus* strain LMD-9." J Bacteriol **191**(14): 4647-55.
- Gendler, S. J. and A. P. Spicer (1995). "Epithelial mucin genes." Annu Rev Physiol **57**: 607-34.
- Gersemann, M., S. Becker, et al. (2009). "Differences in goblet cell differentiation between Crohn's disease and ulcerative colitis." Differentiation **77**(1): 84-94.
- Gionchetti, P., F. Rizzello, et al. (2003). "Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled trial." Gastroenterology **124**(5): 1202-9.
- Giraud, A., S. Arous, et al. (2008). "Dissecting the genetic components of adaptation of *Escherichia coli* to the mouse gut." PLoS Genet **4**(1): e2.
- Gobbato, N., M. Rachid, et al. (2008). "Anti-inflammatory effect of yoghurt in an experimental inflammatory bowel disease in mouse." J Dairy Res **75**(4): 497-504.
- Goh, Y. J., C. Goin, et al. (2011). "Specialized adaptation of a lactic acid bacterium to the milk environment: the comparative genomics of *Streptococcus thermophilus* LMD-9." Microb Cell Fact **10 Suppl 1**: S22.
- Groschwitz, K. R. and S. P. Hogan (2009). "Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis." J Allergy Clin Immunol **124**(1): 3-20; quiz 21-2.
- Haddad, P. (2010). "Probiotiques." passportsanté.net.
- Halpern, G., K. Vruwink, et al. (1991). "Influence of long-term yoghurt consumption in young adults." International Journal of Immunotherapy **7**(4): 5.
- Hansson, G. C. (2012). "Role of mucus layers in gut infection and inflammation." Curr Opin Microbiol **15**(1): 57-62.
- Hartsough, M. T. and K. M. Mulder (1997). "Transforming growth factor-beta signaling in epithelial cells." Pharmacol Ther **75**(1): 21-41.
- Havarstein, L. S. (2010). "Increasing competence in the genus *Streptococcus*." Mol Microbiol **78**(3): 541-4.
- Hermiston, M., T. Simon, et al. (1994). Model systems for studying cell fate specification and differentiation in the gut epithelium. From worms to flies to mice. Physiology of the gastrointestinal tract. L. Johnson. New York, Raven Press: 521-68.
- Jonckheere, N., A. Vincent, et al. (2007). "The human mucin MUC4 is transcriptionally regulated by caudal-related homeobox, hepatocyte nuclear factors, forkhead box A, and GATA endodermal transcription factors in epithelial cancer cells." J Biol Chem **282**(31): 22638-50.
- Jurjus, A. R., N. N. Khoury, et al. (2004). "Animal models of inflammatory bowel disease." J Pharmacol Toxicol Methods **50**(2): 81-92.
- Kim, Y. S. and S. B. Ho (2010). "Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress." Curr Gastroenterol Rep **12**(5): 319-30.

- Koropatkin, N. M., E. A. Cameron, et al. (2012). "How glycan metabolism shapes the human gut microbiota." Nat Rev Microbiol **10**(5): 323-35.
- Lakhdari, O., J. Tap, et al. (2011). "Identification of NF-kappaB modulation capabilities within human intestinal commensal bacteria." J Biomed Biotechnol **2011**: 282356.
- Lee, J. and S. S. Kim (2009). "The function of p27 KIP1 during tumor development." Exp Mol Med **41**(11): 765-71.
- Leimena, M. M., M. Wels, et al. (2012). "Comparative Analysis of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 Transcriptomes by Using DNA Microarray and Next-Generation Sequencing Technologies." Appl Environ Microbiol **78**(12): 4141-8.
- Lesuffleur, T., A. Barbat, et al. (1990). "Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells." Cancer Res **50**(19): 6334-43.
- Letort, C. and V. Juillard (2001). "Development of a minimal chemically-defined medium for the exponential growth of *Streptococcus thermophilus*." J Appl Microbiol **91**(6): 1023-9.
- Lievins-Le Moal, V. and A. L. Servin (2006). "The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota." Clin Microbiol Rev **19**(2): 315-37.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-8.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, et al. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-75.
- Makarova, K., A. Slesarev, et al. (2006). "Comparative genomics of the lactic acid bacteria." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(42): 15611-6.
- Marchesi, J. R. (2011). "Human distal gut microbiome." Environ Microbiol **13**(12): 3088-102.
- Masson, D. (2009). Danone arrête son yaourt Essensis. Stratégies Magazine, **1531**.
- McCormick, D. A., L. W. Horton, et al. (1990). "Mucin depletion in inflammatory bowel disease." J Clin Pathol **43**(2): 143-6.
- McFarland, L. V. (1998). "Epidemiology, risk factors and treatments for antibiotic-associated diarrhea." Dig Dis **16**(5): 292-307.
- McGuckin, M. A., R. Eri, et al. (2009). "Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases." Inflamm Bowel Dis **15**(1): 100-13.
- Messaoudi, S., G. Kergourlay, et al. (2011). "Identification of lactobacilli residing in chicken ceca with antagonism against *Campylobacter*." Int Microbiol **14**(2): 103-10.
- Metchnikoff, R. (1901). "Sur la flore du corps humain." Manch Lit Philos Soc **45**: 38.
- Meyer, A. L., I. Elmadfa, et al. (2007). "Probiotic, as well as conventional yogurt, can enhance the stimulated production of proinflammatory cytokines." J Hum Nutr Diet **20**(6): 590-8.
- Miettinen, M., S. Matikainen, et al. (1998). "Lactobacilli and streptococci induce interleukin-12 (IL-12), IL-18, and gamma interferon production in human peripheral blood mononuclear cells." Infect Immun **66**(12): 6058-62.
- Mimura, T., F. Rizzello, et al. (2004). "Once daily high dose probiotic therapy (VSL#3) for maintaining remission in recurrent or refractory pouchitis." Gut **53**(1): 108-14.
- Morisset, M., C. Aubert-Jacquin, et al. (2011). "A non-hydrolyzed, fermented milk formula reduces digestive and respiratory events in infants at high risk of allergy." Eur J Clin Nutr **65**(2): 175-83.
- n°88-1203, D. (1988). Décret n°88-1203 du 30 décembre 1988 relatif aux laits fermentés et au yaourt ou yoghourt. NOR: ECOC8800150D G. français. **2**.
- Nanthakumar, N. N., D. Dai, et al. (2005). "Regulation of intestinal ontogeny: effect of glucocorticoids and luminal microbes on galactosyltransferase and trehalase induction in mice." Glycobiology **15**(3): 221-32.

- Narushima, S., T. Sakata, et al. (2010). "Inhibitory effect of yogurt on aberrant crypt foci formation in the rat colon and colorectal tumorigenesis in RasH2 mice." Exp Anim **59**(4): 487-94.
- Nathalie. (2008). "Danone accusé de publicité mensongère." Danone Groupe Média Komodo. Retrieved 21/05/2012, 2012.
- Ogier-Denis, E. (2012a). "Brevet" OGIERDENI01285MC 2012
- Ogier-Denis, E. (2012b). Etude des effets de santé de bactéries lactiques liés à leurs propriétés "mucophiles". Paris.
- Ogita, T., M. Nakashima, et al. (2011). "*Streptococcus thermophilus* ST28 ameliorates colitis in mice partially by suppression of inflammatory Th17 cells." J Biomed Biotechnol **2011**: 378417.
- Ohland, C. L. and W. K. Macnaughton (2010). "Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **298**(6): G807-19.
- Ongol, M. P., T. Iguchi, et al. (2008). "Potential of selected strains of lactic acid bacteria to induce a Th1 immune profile." Biosci Biotechnol Biochem **72**(11): 2847-57.
- Ornelas, I. J., M. Galvan-Potrillo, et al. (2007). "Protective effect of yoghurt consumption on *Helicobacter pylori* seropositivity in a Mexican population." Public Health Nutr **10**(11): 1283-7.
- Ozdemir, C., M. Akdis, et al. (2009). "T regulatory cells and their counterparts: masters of immune regulation." Clin Exp Allergy **39**(5): 626-39.
- P. Marteau, D. B., D. Brassart, G. Corthier, J. Doré, Heyman, C. Matuchansky, C. Michel, J.-L. Berta, J.-C. Boclé, J.- Antoine, I. Auger, W. Caerss, C. Cherbut, F. Pagerey, C. Cavadini, V. Delahaye-Sarraute, H. Durand, V. Duvillier, C. Farrokh, R. Ducluzeau, B. Rousseau, A. Fazel (2005). Effets des probiotiques et prébiotiques sur la flore et l'immunité de l'homme adulte.
- Pala, V., S. Sieri, et al. (2011). "Yogurt consumption and risk of colorectal cancer in the Italian European prospective investigation into cancer and nutrition cohort." Int J Cancer **129**(11): 2712-9.
- Pasparakis, M. (2009). "Regulation of tissue homeostasis by NF-kappaB signalling: implications for inflammatory diseases." Nat Rev Immunol **9**(11): 778-88.
- Pene, J., F. Rousset, et al. (1988). "IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin 4 and suppressed by interferons gamma and alpha and prostaglandin E2." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(18): 6880-4.
- Peng, S., J. Y. Lin, et al. (2007). "Antiallergic effect of milk fermented with lactic acid bacteria in a murine animal model." J Agric Food Chem **55**(13): 5092-6.
- Perdigon, G., S. Alvarez, et al. (1995). "Immune system stimulation by probiotics." J Dairy Sci **78**(7): 1597-606.
- Peters, R. K., M. C. Pike, et al. (1992). "Diet and colon cancer in Los Angeles County, California." Cancer Causes Control **3**(5): 457-73.
- Phillipson, M., M. E. Johansson, et al. (2008). "The gastric mucus layers: constituents and regulation of accumulation." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **295**(4): G806-12.
- Podolsky, D. K. (2002). "Inflammatory bowel disease." N Engl J Med **347**(6): 417-29.
- Puri, P., A. Rattan, et al. (1996). "Splenic and intestinal lymphocyte proliferation response in mice fed milk or yogurt and challenged with *Salmonella typhimurium*." Int J Food Sci Nutr **47**(5): 391-8.
- Qin, J., R. Li, et al. (2010). "A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing." Nature **464**(7285): 59-65.
- Ravitz, M. J. and C. E. Wenner (1997). "Cyclin-dependent kinase regulation during G1 phase and cell cycle regulation by TGF-beta." Adv Cancer Res **71**: 165-207.
- Resta-Lenert, S. and K. E. Barrett (2003). "Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC)." Gut **52**(7): 988-97.

- Resta-Lenert, S. and K. E. Barrett (2006). "Probiotics and commensals reverse TNF-alpha- and IFN-gamma-induced dysfunction in human intestinal epithelial cells." Gastroenterology **130**(3): 731-46.
- Rodriguez, C., M. Medici, et al. (2010). "Therapeutic effect of *Streptococcus thermophilus* CRL 1190-fermented milk on chronic gastritis." World J Gastroenterol **16**(13): 1622-30.
- Roduit, C., R. Frei, et al. (2012). "Development of atopic dermatitis according to age of onset and association with early-life exposures." J Allergy Clin Immunol.
- Rofidal, T. (2004). La physiologie de la digestion. Alimentation et Nutrition de la personne polyhandicapée, CESAP: 15 - 21.
- Rong, M., E. A. Rossi, et al. (2005). "Expression and localization of Muc4/sialomucin complex (SMC) in the adult and developing rat intestine: implications for Muc4/SMC function." J Cell Physiol **202**(1): 275-84.
- Rul, F., L. Ben-Yahia, et al. (2011). "Impact of the metabolic activity of *Streptococcus thermophilus* on the colon epithelium of gnotobiotic rats." J Biol Chem **286**(12): 10288-96.
- Saavedra, J. M., N. A. Bauman, et al. (1994). "Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus." Lancet **344**(8929): 1046-9.
- Salzano, A. M., S. Arena, et al. (2007). "A widespread picture of the *Streptococcus thermophilus* proteome by cell lysate fractionation and gel-based/gel-free approaches." Proteomics **7**(9): 1420-33.
- Santos Rocha, C., O. Lakhdari, et al. (2012). "Anti-inflammatory properties of dairy lactobacilli." Inflamm Bowel Dis **18**(4): 657-66.
- Sartor, R. B. (1997). "Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel diseases." Am J Gastroenterol **92**(12 Suppl): 5S-11S.
- Sartor, R. B. (2008). "Microbial influences in inflammatory bowel diseases." Gastroenterology **134**(2): 577-94.
- Schleifer, K.-H., Ehrmann, M, Krusch, U, Neve, H (1991). "Revival of the species *Streptococcus thermophilus* (ex Orla-Jensen, 1919) nom. rev." Syst Appl Microbiol **14**: 2.
- Sekirov, I., S. L. Russell, et al. (2010). "Gut microbiota in health and disease." Physiol Rev **90**(3): 859-904.
- Soderholm, J. D., P. C. Yang, et al. (2002). "Chronic stress induces mast cell-dependent bacterial adherence and initiates mucosal inflammation in rat intestine." Gastroenterology **123**(4): 1099-108.
- Sokol, H., B. Pigneur, et al. (2008). "Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(43): 16731-6.
- Solis, G., C. G. de Los Reyes-Gavilan, et al. (2010). "Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast-milk and the infant gut." Anaerobe **16**(3): 307-10.
- Sun, Z., X. Chen, et al. (2011). "Complete genome sequence of *Streptococcus thermophilus* strain ND03." J Bacteriol **193**(3): 793-4.
- Thomas, M., L. Wrzosek, et al. (2011). "Carbohydrate metabolism is essential for the colonization of *Streptococcus thermophilus* in the digestive tract of gnotobiotic rats." PLoS One **6**(12): e28789.
- Van de Water, J., C. L. Keen, et al. (1999). "The influence of chronic yogurt consumption on immunity." J Nutr **129**(7 Suppl): 1492S-5S.
- van den Bogaard, P. T., P. Hols, et al. (2004). "Sugar utilisation and conservation of the gal-lac gene cluster in *Streptococcus thermophilus*." Syst Appl Microbiol **27**(1): 10-7.

- van der Sluis, M., J. Bouma, et al. (2008). "Combined defects in epithelial and immunoregulatory factors exacerbate the pathogenesis of inflammation: mucin 2-interleukin 10-deficient mice." Lab Invest **88**(6): 634-42.
- Wollowski, I., S. T. Ji, et al. (1999). "Bacteria used for the production of yogurt inactivate carcinogens and prevent DNA damage in the colon of rats." J Nutr **129**(1): 77-82.
- Zareie, M., K. Johnson-Henry, et al. (2006). "Probiotics prevent bacterial translocation and improve intestinal barrier function in rats following chronic psychological stress." Gut **55**(11): 1553-60.
- Zhu, Y., L. Xiao, et al. (2010). "Competition between yogurt probiotics and periodontal pathogens in vitro." Acta Odontol Scand **68**(5): 261-8.



Réseau 2 : Interactions des gènes induits sur une puce de transcriptomique chez des rats inoculés par *S. thermophilus* LMD-9 (n=3) par rapport à des rats maintenus axéniques (n=3).

Les réseaux ont été identifiés informatiquement par le logiciel Ingenuity Pathway Analysis software (IPA; <http://www.ingenuity.com>) à partir des données de la littérature depuis les 95 gènes les plus différentiellement exprimés. Un maximum de 35 gènes a été autorisé pour créer ces réseaux. Les flèches pleines montrent une interaction directe, les flèches en pointillés montrent une interaction indirecte. Les gènes différentiellement exprimés sont pleins, les gènes réprimés sont entourés en bleu, les gènes en blanc ne sont pas modifiés. Ces données sont extraites de la thèse de F. Chegdani (Chegdani 2010).

Gènes présents dans les réseaux :

Réseau 1 : ANG, ANXA8, C5ORF13, CIITA, CNIH, CTSS, FGF10, GDF15, CLI1, GRAMD3, KLF4, KRT8, KRT19, MAPK1, MIR302A, MUC5AC, NIPAL2, OSR2, Pdgr, Pki, PKIG, PPP2R2A, RFX5, RHOB, RNH1, S100A4, SAR1B, SLC26A3, SLC2A1, sodium, TAX1BP3, TGFB1, TGFB1R, TGIF1, TMEM54.

Réseau 2 : ANKS1A, ARCN1, ARSG, CCL18, CHP2, CLCA1, CRADD, DEFB103A, FGFR10P, GD3+, IkappaB-kinase, IL10, ILR, IL10RB, IL22R1-IL10R2, MAPK3, MEFV, MIR298, NLR, p85 (pi3kr), PPP2CB, PPP2R1B, PPP2R5B, PPP2R5E, RELA, SCIN, SFI1, SLC9A2, TLR5, TMEM9B, TNF, TNFAIP8, TNFSF13B, UBD, UCN3.

Résumé

Mon stage dans le laboratoire ProbiHôte de l'unité Micalis a porté sur la caractérisation du dialogue entre la bactérie *Streptococcus thermophilus*, bactérie d'intérêt industriel, et le tractus gastro-intestinal (TGI). Pour cela j'ai travaillé sur un modèle d'animal monoxénique, c'est-à-dire ne possédant que cette bactérie dans son TGI. Ainsi, j'ai cherché à identifier d'une part, les principaux effets sur le côlon en réponse à l'implantation de la bactérie dans le TGI et d'autre part, les procédés d'adaptation développés par la bactérie au cours de son implantation.

J'ai mis en évidence une optimisation du métabolisme des disaccharides chez *S. thermophilus* après passage dans le TGI. Par ailleurs l'implantation de *S. thermophilus* a montré une première phase d'adaptation que j'ai traduite comme une étape de sélection des bactéries présentant les meilleures performances métaboliques.

En m'appuyant sur les résultats préalablement obtenus par mon laboratoire sur le rat, j'ai confirmé un effet inducteur de *S. thermophilus* sur la différenciation des cellules productrices de mucus et j'ai proposé l'implication des effecteurs cellulaires TNF α et TGF β , aussi impliqués dans la réponse anti-inflammatoire. Partis de ce constat, nous avons souhaité vérifier notre modèle sur des animaux à flore conventionnelle dont une déficience en mucus induisait une inflammation du côlon. J'ai alors créé un mutant résistant à un antibiotique afin de suivre l'implantation de la bactérie parmi ce microbiote complexe et d'étudier l'impact de *S. thermophilus* sur les paramètres inflammatoires au niveau de la muqueuse intestinale.

Abstract

My internship in the ProbiHôte laboratory of the Micalis unit has focused on the characterization of the dialogue between the bacteria *Streptococcus thermophilus* and the gastro-intestinal tract (GIT). To study this dialogue, I worked on a gnotobiotic animal model carrying only one bacteria in its GIT. I have investigated the main effects undergone by the GIT in response to bacterial colonization and the adaptation process developed by *S. thermophilus* in the course of its implantation.

I demonstrated a boost of disaccharide metabolism in *S. thermophilus* after implantation. Knowing that as a first step of low population occurs the first week after inoculation of the animals, I have suggested an adaptation process during this time which selects bacteria based on their metabolic properties.

Drawing from my laboratory's previous results, I have confirmed an enhancing effect of *S. thermophilus* on mucus cell differentiation, and I have suggested a role of the TNF α and TGF β signaling cell factors also involved in the anti-inflammatory response. Likewise, we have checked our model on conventional flora colonized animals in which a deficiency in mucus production induces colitis. For the purpose of following bacterial implantation among the microbiota, I have constructed a kanamycin-resistant mutant of *S. thermophilus*.