

**CONFERENCE INTRODUCTIVE :**

**« Le microbiote digestif et l'étude de son  
métagénome »**

***Par Gérard Corthier***

***Directeur de Recherches Honoraire INRA***

[PO]

## **Le microbiote digestif et l'étude de son métagénome**

G. Corthier, Directeur de Recherches Honoraire, INRA, France

Nous sommes habités par une importante population microbienne située principalement dans le gros intestin. A titre d'exemple : ces bactéries sont 10 fois plus nombreuses que les cellules de notre corps, la moitié de nos selles est constituée de bactéries, le génome de toutes ces bactéries (métagénome) est 100 fois supérieur au nôtre. Cette masse microbienne est nommée le microbiote et le séquençage de l'ensemble de son génome est très avancé. Ce sont les projets « métagénome » où la France et l'Europe ont une nette avance (pour le moment) sur le reste du monde. Pourquoi un tel effort de recherche ? Parce que notre vie ne serait pas possible sans la présence dans notre tractus digestif de ces populations bactériennes. De l'équilibre de cet écosystème microbien dépend l'assimilation d'une grande partie de notre alimentation, la production de vitamines, les flatulences et le confort digestif mais aussi l'obésité, la détoxification de composés induisant le cancer et les maladies inflammatoires de l'intestin. De façon plus globale encore, sans microbiote digestif notre système immunitaire serait atrophié et incapable de répondre aux agents pathogènes. Des recherches récentes suggèrent aussi que de l'équilibre du microbiote pourrait dépendre une forme de diabète et, pour une partie, notre comportement. La disponibilité d'outils nouveaux permet d'analyser maintenant la diversité du microbiote et de ses fonctions. On espère ainsi lever assez rapidement le voile sur cet inconnu propre à chacun de nous, le microbiote.

**Thème 1 :**

**Circulation – Dissémination  
des microorganismes dans leurs environnements**

## **Prévalence et circulation de pathogènes humains et de bactéries résistantes aux antibiotiques dans l'environnement**

Alain Hartmann, UMR 1347 Agroécologie

Les sols constituent un réservoir important de biodiversité microbienne. Parmi ces microorganismes, certains sont capables d'interactions avec l'Homme (commensalisme) ou d'induire des pathologies (maladies infectieuses aiguës ou chroniques). De plus, les bactéries du sol constituent un réservoir important de gènes de résistance aux antibiotiques. Les activités agricoles comme l'élevage et le recyclage de produits résiduels organiques dans les sols peuvent constituer une source de bactéries pathogènes, résistantes aux antibiotiques ou commensales de l'Homme. Ces pratiques agricoles, qui sont en constante évolution, doivent donc aussi être évaluées en termes de risque sanitaire sur le long terme. Les réservoirs environnementaux potentiels (sols, eau, animaux ...) pour ces populations bactériennes doivent donc être définis et analysés ainsi que la circulation de ces populations bactériennes entre ces différents compartiments. De nombreux facteurs environnementaux influencent le devenir et la circulation de ces populations bactériennes pathogènes ou commensales dans l'environnement. Parmi les facteurs abiotiques on peut citer les caractéristiques pédologiques des sols (physico-chimie), le climat (température, flux hydriques ...), ces facteurs présentent des variations importantes (évolution/dégradation de certains sols, changement climatique). Les facteurs biotiques tels que la structure et la diversité des communautés microbiennes (au travers de phénomènes d'antibiose, de compétition trophique et de communication cellulaire) peuvent également être déterminants dans la survie des pathogènes dans l'environnement. La maîtrise du risque sanitaire nécessite une approche intégrée impliquant à la fois des méthodes d'écologie microbienne et des méthodes d'études des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'adaptation de ces bactéries aux conditions environnementales.

## La biodiversité levurienne du raisin et du vin : la place de l'homme ?

Pr H. Alexandre

*Laboratoire VALMIS-UMR PAM AgrosupDijon/UB  
Institut Universitaire de la Vigne et du Vin Jules Guyot*

Les microorganismes sont apparus sur terre il y a plus de 3.5 milliards d'années, mais les levures sont apparues il y a 1.5 milliards d'année si l'on en croit les études relatives à l'horloge moléculaire. Depuis leur apparition, les levures se sont diversifiées. La première édition de « *The yeasts, a taxonomic study* » décrivait 164 espèces en 1952, puis 349 espèces en 1970, 500 en 1984, 700 en 1998 et 1500 dans l'édition de 2011. Les premiers stades des fermentations spontanées, c'est-à-dire conduite par les levures naturellement présentes sur le raisin, sont caractérisés par des la présence de levures appartenant aux espèces *Hanseniaspora uvarum* qui sont dominantes. En proportions plus faibles, il y a également d'autres levures comme les *Candida*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Hansenula* et *Kluyveromyces* (Fleet et Heard, 1993). Au fur et à mesure que la fermentation avance, l'éthanol s'accumule dans le milieu, ce qui est favorable à la levure de fermentation *Saccharomyces cerevisiae* qui domine alors le milieu. Ainsi, le profil sensoriel des vins qui est lié à sa composition aromatique provient de la contribution de différentes espèces de levures.

Selon le concept de « domestication » des traits phénotypiques ont divergé entre l'espèce domestiquée et son ancêtre. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, il y a un faisceau d'évidence qui montre que les divergences phénotypiques ont accompagnées les divergences génétiques entre les souches de vins et celles qui n'en sont pas issus. Ces divergences étant du aux pratiques humaines. Ainsi, *Saccharomyces cerevisiae* du vin est plus tolérante aux sulfites que la même espèce issue d'autres niches écologique. La pratique de l'élevage des vins en fûts sans remplissage (ouillage) a conduit à l'apparition de levures à voile dans les régions ou cette pratique est usitée. Nous verrons que ce sont les pratiques humaines qui ont conduit à l'apparition de phénotypes particuliers chez cette espèce et qui s'explique par des modifications génétiques

## Genetic and phenotypic characterization of commensal and clinical *Candida albicans* isolates reveals heterogeneous distribution of adherence and invasiveness properties

F. Vincent<sup>1</sup>, M. Sautour<sup>1,2</sup>, C. L'Ollivier<sup>1,2</sup>, C. Truntzer<sup>3</sup>, A. Bonnin<sup>1,2</sup>, F. Dalle<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>UMR 1347 Agroécologie AgroSup/INRA/uB - Pôle MERS, 17 rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon Cedex, France <sup>2</sup> Parasitology and Mycology department, Plateau Technique de Biologie du CHU, 2 rue A. Ducoudray, BP 37013, 21070 Dijon Cedex, France; <sup>3</sup> Clinical Innovation Proteomic Platform (CLIPP), CHU Dijon CLIPP CGFL, Dijon, France.

Considering *Candida albicans* as a primarily clonal model of reproduction, distinct lineages of *C. albicans* could propagate independently, each clonal lineage having possibly variations in biological traits contributing to the pathogenicity of the fungus such as adherence or the yeast-hyphae transition. Indeed, adherence to epithelial cells is considered a virulence trait of *C. albicans* since contributing to the first contact of the fungus with the host's epithelial layers. Moreover the ability of *C. albicans* to switch from the yeast to the hyphae form is an important determinant of *C. albicans* virulence since favoring invasion of the fungus into the host's tissues.

Using a Multi-Locus Microsatellite Typing, (MLMT) approach, we previously addressed the question of the pathogenicity of lineages of *C. albicans* with regard to their origin in three series of *C. albicans* isolates: 82 commensal isolates collected in healthy individuals, 46 invasive bloodstream isolates and 46 of non-bloodstream clinical isolates. In the current study, invasiveness (i.e. cytotoxicity effect) and adherence to epithelial cells of representative strains of the 3 series previously characterized at the genotypic level were investigated in the Caco-2 *in vitro* model of human intestinal barrier. Correlations between invasiveness, adherence, genotype and origin were then investigated.

Principal component factor analysis failed to reveal specific correlation between genotypic and phenotypic characters for all of the strains studied. However, it was possible to group strains into three clusters based on their capabilities to adhere to and to invade intestinal cells. Interestingly, some clinical strains presented a decrease in their cytotoxic effect associated with a defect in their filamentation capability.

To illustrate these observations, the clinical strain n°926 was further characterized *in vitro* with regard to its filamentation capabilities as compared to the reference strain *C. albicans* SC5314. Colony morphology on specific agar media reported a strong defect in its filamentation ability. This was confirmed by microscopic observations in specific liquid media. Despite similar adherence capability to epithelial cells, cytotoxicity of the strain n°926 was significantly lower than the reference strain *C. albicans* SC5314. These data suggest that (i) invasion of epithelial cells is mainly driven by the ability of *C. albicans* to switch from the yeast to the hyphal form and (ii) natural *C. albicans* strains could harbor atypical defect in their filamentation capabilities.

Experiments are in progress in a mouse model of disseminated candidiasis originating from the gastro-intestinal tract to confirm the defect in filamentation capabilities of *C. albicans* natural strains observed *in vitro*.

[POP2]

## **Diffusion des souches résistantes de *Pseudomonas aeruginosa* via les réseaux d'eau usée : des effluents hospitaliers à la rivière.**

C. Slekovec<sup>a</sup>, P. Cholley<sup>a</sup>, M. Thouverey<sup>a</sup>, P. Plésiat<sup>b</sup>, D. Talon<sup>a</sup>, X. Bertrand<sup>a</sup>, D. Hocquet<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Service d'hygiène hospitalière, Centre Hospitalier Universitaire, Besançon, France  
UMR 6249 Chrono-environnement, Université de Franche Comté, Centre Hospitalier  
Universitaire, Besançon

<sup>b</sup> Centre National de Référence de la Résistance aux Antibiotiques, Centre Hospitalier  
Universitaire, Besançon, France.  
cslekovec@chu-besancon.fr

Les effluents hospitaliers, véhiculant des souches de *Pseudomonas aeruginosa*, sont traités dans une station d'épuration (STEP) avant d'être rejetés dans la rivière. Nous avons évalué le risque de dissémination des souches hospitalières résistantes de *Pseudomonas aeruginosa* dans l'environnement via le réseau d'eau usée.

L'étude a été conduite dans l'agglomération bisontine durant 10 semaines afin de réaliser 11 séries de prélèvements hebdomadaires. Les sites de prélèvement concernaient des effluents hospitaliers et communautaires, l'eau en entrée et sortie de la STEP, les boues produites par la STEP et destinées à l'épandage, ainsi que la rivière en amont et en aval de la STEP. La charge en *P. aeruginosa* a été quantifiée. Nous avons déterminé le profil de résistance de 225 souches. Toutes les souches résistantes ont été génotypées par électrophorèse en champ pulsé et par séquençage multiple de gènes.

Plus de 95 % des prélèvements réalisés contenaient des souches de *P. aeruginosa*, avec des charges importantes dans les effluents hospitaliers ainsi que dans les boues. La majorité des souches résistantes de *P. aeruginosa* a été isolée dans des prélèvements d'effluents hospitaliers. La station d'épuration a permis de diminuer la charge en bacille pyocyanique de 94 % toutefois, ce traitement ne permettait pas de réduire la proportion de souches résistantes. La charge en *P. aeruginosa* de la rivière était plus élevée en aval qu'en amont de la STEP. Nous avons identifié des séquences types contenant des souches résistantes dans les effluents hospitaliers, en sortie de la STEP ainsi que dans la rivière en aval de la station d'épuration. L'eau traitée et les boues destinées à l'épandage constituent donc un risque réel de contamination environnementale par des souches hospitalières résistantes de *P. aeruginosa*.

## Développement de la Signature Tagged Mutagenesis de *Lactobacillus casei* pour identifier les gènes impliqués dans le maintien dans l'intestin.

Licandro-Seraut H.<sup>(a)(b)</sup>, Scornec H.<sup>(b)</sup>, Cavin J. F.<sup>(b)</sup>, Pédrón T.<sup>(a)</sup>, Sansonetti P.<sup>(a)</sup>

<sup>(a)</sup>Unité de Pathogénie Microbienne Moléculaire, Institut Pasteur, Paris, France.

<sup>(b)</sup>UMRA Procédés Alimentaires et Microbiologiques, AgroSup Dijon / Université de Bourgogne, Dijon, France.  
helene.scornec@yahoo.fr

*Lactobacillus casei* est une espèce probiotique bien documentée concernant les bénéfices qu'elle apporte à l'hôte, mais les mécanismes impliqués dans les interactions symbiotiques avec l'hôte sont encore peu connus. Ceci est notamment dû au manque d'outils génétiques fiables pour réaliser une génétique inverse chez les Lactobacilles. Le but de cette étude est de développer une stratégie basée sur la Signature Tagged Mutagenesis (STM) (1) qui permet d'identifier les gènes bactériens requis pour la persistance dans l'intestin. Deux points majeurs ont été développés: (i) un système efficace de mutagenèse aléatoire chez *L. casei* et (ii) une méthode de criblage phénotypique fiable pour déterminer la capacité de chaque mutant à se maintenir dans l'intestin.

Un système à deux plasmides pour la mutagenèse par transposition, s'appelant P<sub>junc</sub>-TpaseIS<sub>1223</sub>, a été utilisé (2). Un premier plasmide exprimant transitoirement TpaseIS<sub>1223</sub>, gène de la transposase IS1223 de *Lactobacillus johnsonii*, a été associé à un second plasmide transposable et suicide comportant les séquences cibles de TpaseIS<sub>1223</sub>. Soixante-dix tags ont été clonés dans le second plasmide transposable générant ainsi 70 plasmides transposables tagués. Ce système a donné lieu à une transposition efficace du plasmide transposable tagué dans *L. casei*. Une banque de mutants par transposition tagués composée de 60 pools de 70 mutants différents a été organisée de façon à ce que chaque mutant tagué du pool puisse être quantifié par qPCR en temps réel.

Quatre pools de 70 mutants tagués ont été mis en compétitions dans des anses intestinales de lapin pendant 16 h pour déterminer leur habilité à se maintenir dans l'intestin. Chaque pool a été injecté dans les anses de deux lapins différents. Pour chaque mutant, la variation quantitative entre le pool inoculé et le pool récupéré a été déterminée grâce à la qPCR en temps réel. Deux mutants ont montré une altération de leur capacité de maintien. Les mêmes mutants ont été identifiés chez les deux lapins, validant ainsi la méthode de criblage.

Cette stratégie validée sera utilisée pour identifier les gènes impliqués dans le maintien des probiotiques dans l'intestin et pourra être utilisée pour étudier d'adaptation bactérienne à d'autres environnements particuliers.

(1) Hensel, M., J. E. Shea, C. Gleeson, M. D. Jones, E. Dalton, and D. W. Holden. 1995. Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science* 269:400-403.

(2) Licandro-Seraut H., Brinster S., van de Guchte M., Scornec H., Maguin M., Sansonetti P., Cavin J. F., Serron P., Development of an efficient *in vivo* P<sub>junc</sub>-TpaseIS<sub>1223</sub>-based system for random transposon mutagenesis of *Lactobacillus casei*. Accepted (AEM00531-12).

[POP4]

## Effet d'une supplémentation prébiotique (technologie FAP®) de la mère sur la mise en place de l'écosystème digestif dans les fèces du poulain

C. Faubladié<sup>a</sup>, V. Jullian<sup>a</sup>, I. Delporte<sup>b</sup> et C. Philippeau<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Agrosup Dijon – USC INRA Nutrition du cheval athlète - Dijon

<sup>b</sup>Original Process – Lilles  
c.faubladié@agrosupdijon.fr

Chez le cheval, l'écosystème bactérien du gros intestin joue un rôle primordial dans la digestion des fourrages en nutriments énergétiques. Comme chez les autres mammifères, l'efficacité de cette digestion pourrait dépendre de la mise en place des différentes flores bactériennes dans le tractus digestif du poulain dès la naissance. Le premier objectif de notre étude a été de décrire la mise en place de l'écosystème bactérien digestif dans les fèces du poulain de la naissance à deux mois d'âge. Notre deuxième objectif a été de tester l'impact d'une supplémentation de la mère en prébiotiques FAP® (Original Process, France) autour du poulinage sur la mise en place de cet écosystème chez le poulain.

Dix couples juments/poulains ont été conduits en conditions contrôlées. Les juments ont été réparties en deux groupes : supplémentées (S) ou non (NS) avec des FAP\* ; EQUIPROCESS® granulé du 285<sup>ème</sup> jour de gestation jusqu'à 60 jours après poulinage (JN0) et la pâte orale FLORE PROCESS® de JN0 à JN3. Les poulains n'ont reçu aucune supplémentation. La concentration de différentes flores digestives fonctionnelles et leur activité fermentaire (concentration en acides gras volatils, AGV) ont été quantifiées dans les fèces des poulains, de la naissance (J0) à 60 jours de vie (J60).

Les poulains étaient tous en bonne santé à la naissance. Les flores anaérobie totale, lactico-lytique et amylo-lytique se sont implantées dès la naissance et ont atteint un niveau très élevé dès les premiers jours de vie. La flore cellulolytique a été détectée plus tard à partir de 5 jours d'âge (+/- 3j) puis a augmenté progressivement pour atteindre les valeurs adultes à J30. Au regard de l'évolution des profils en AGV, la flore cellulolytique semblait être active très tôt, dès la deuxième de vie alors que les poulains ne consommaient que très peu de fourrages par rapport au lait maternel. L'ingestion de fourrages par le poulain dans ses premiers jours de vie pourrait avoir un rôle à jouer dans l'implantation et l'activation de cette flore. A partir de deux mois d'âge, le profil en AGV était stable et comparable à celui d'un adulte, suggérant que l'écosystème bactérien digestif en place serait capable de digérer les parois végétales contenues dans les aliments type fourrages et granulés.

La supplémentation de la mère en prébiotique a accéléré l'implantation des flores anaérobies totales et lactico-lytiques au cours des trois premiers jours de vie (p=0.005 and p=0.020 respectivement) et a stimulé le démarrage des activités de dégradation du lactate au cours des cinq premiers jours de vie. Les effets de la supplémentation maternelle en prébiotique sur la mise en place de l'écosystème digestif du poulain pourraient être en partie expliquée par une augmentation de la quantité et/ou d'une modification de la qualité du lait produit par la jument supplémentée dans les premiers jours après poulinage.

\*technologie exclusive de germination et de fermentation lactique d'orge à partir de 8 micro-organismes sélectionnés et déposés à la CNCM (Collection nationale de cultures de micro-organismes)- ORIGINAL PROCESS

## Single cell analysis evidence Heterogeneous expression of the Agr communication system of *Listeria monocytogenes*

Anne-Laure Vivant<sup>1,2</sup>, Dominique Garmyn<sup>1,2</sup>, Laurent Gal<sup>3,2,†</sup>, Romain Briandet<sup>4</sup>, Morgan Guilbaud<sup>5</sup>, Jean-Paul Lemaître<sup>1,2</sup>, Alain Hartmann<sup>1,2</sup> and **Pascal Piveteau**<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Université de Bourgogne, UMR 1229, F-21000 Dijon, France ; <sup>2</sup>INRA, UMR 1229, F-21000 Dijon, France ; <sup>3</sup>AgroSup Dijon F-21000 Dijon, France ; <sup>4</sup>INRA, UMR 1319 MICALIS, F-78350 Jouy-en-Josas, France ; <sup>5</sup>AgroParisTech, UMR 1319 MICALIS, F-78350 Jouy-en-Josas, France

Communication, often referred as Quorum Sensing, is involved in the adaptation of most bacteria to their environment. In the genus *Listeria*, the *agr* communication system affects the biology of *Listeria monocytogenes* during saprophytic life (biofilm formation) and during infection. In the present study, we investigated *in situ agr* expression of six isolates of *L. monocytogenes* by combining *gfp* reporters, flow cytometry and fluorescent microscopy during planktonic growth and dynamic flow cell biofilm set ups. Unexpectedly, during growth in TSB homogenised liquid cultures incubated at 25°C, while auto-inducer concentration was uniform, statistically significant results showed that two distinct sub-populations existed within cultures of the six isolates and the percentage of AGR-ON cells ranged from 15% to 73% according to the isolate tested. At 37°C, it varied from 15% to 48%.

Finally, in flow cells, 69% to 80% of the cells of 24 h biofilms expressed Agr but these differences were not significant. Our results highlight the need to integrate individuality of bacteria in order to decipher the mechanisms of *Listeria monocytogenes* adaptation to its environment.

## Survie et/ou réactivation de microorganismes du sol sous hautes pressions gazeuses

M. Ragon<sup>a</sup>, S. Guyot<sup>a</sup>, J-M. Perrier-Cornet<sup>a</sup>, A. Hartmann<sup>b</sup>, P. Gervais<sup>a</sup>

<sup>a</sup> AgroSup Dijon / Université de Bourgogne / UMR-A 02.102 Procédés Alimentaires et Microbiologiques – Equipe Procédés Microbiologiques et Biotechnologiques - Dijon

<sup>b</sup> AgroSup Dijon / INRA / Université de Bourgogne / UMR 1347 Agroécologie - Dijon  
m.ragon@agrosupdijon.fr

Le sol constitue une réserve considérable de microorganismes représentatifs de nombreuses communautés cellulaires. Les recherches reposent sur l'hypothèse qu'il existe, dans les échantillons de sol, des communautés microbiennes adaptées à des conditions physiques (pression, température) très différentes de celles rencontrées dans nos laboratoires : soit parce que les conditions de milieu ont changé (sol), soit parce que les conditions de prélèvement sont très différentes des conditions de culture (grands fonds marins). Dans cette optique, l'utilisation des hautes pressions gazeuses (200-1000 bars dans un premier temps) est envisagée afin d'essayer de réactiver des microorganismes dormants que l'on ne sait pas cultiver. La découverte et la culture de ces microorganismes pourrait permettre de découvrir des formes microbiennes avec des adaptations qu'il serait possible d'utiliser à des fins de connaissance sur la plasticité cellulaire ou d'exploiter industriellement certains éléments spécifiques du métabolisme (enzymes, produits).

L'objectif de la présente étude est de valider l'utilisation de procédés originaux de culture sous Hautes Pressions. La maîtrise de ces procédés devrait permettre d'approcher les conditions optimales de culture par l'utilisation d'enceintes Hautes Pressions spécifiques :

- (1) **Enceintes « aveugles »** : elles permettent de placer des échantillons sous pression et de maintenir cette pression constante au cours de l'incubation mais ne permettent pas de visualiser la croissance des microorganismes lors du traitement hyperbare. Elles possèdent un volume utile d'environ 100 cm<sup>3</sup> permettant l'introduction de 3 petites boîtes de Petri (4 cm de diamètre) et résistent à des pressions allant de 250 à 2000 bars selon le modèle de l'enceinte.
- (2) **Enceintes « optiques » ou cellules de visualisation** : elles permettent de visualiser les échantillons et de suivre, en temps réel, la croissance microbienne au cours du traitement hyperbare. Elles peuvent être utilisées pour réaliser des cultures sous pression gazeuse isostatique en milieu solide ou sous pression hydrostatique en milieu liquide. La présence d'une double enveloppe permet de réguler la température d'incubation. Cette cellule de visualisation peut résister à des pressions allant jusqu'à 4000 bars.

Dans un premier temps, la levure *Saccharomyces cerevisiae* a été utilisée comme microorganisme modèle. Son taux de croissance a été mesuré entre 1 et 500 bars dans ces deux types d'enceintes. Une étude comparative a été menée afin de retenir l'enceinte la plus adaptée au suivi de la croissance microbienne.

Dans un second temps, des échantillons de différents sols (terrestre et marin) ont été récupérés afin d'identifier les populations microbiennes piézotolérantes et/ou piézophiles éventuelles. Les échantillons de sol terrestre proviennent du domaine de Bretenières (I.N.R.A., Dijon) et les échantillons de sol marin ont été prélevés dans deux carottes profondes du Bassin Indien Central (Océan Indien) à plus de 5000 m de profondeur et ont été gracieusement fournis par la carothèque océanique du Muséum National d'Histoire Naturelle.

[P1]

## MISE EN PLACE D'UN MODELE *IN VIVO* DE COLONISATION DIGESTIVE STABLE A *C. ALBICANS* CHEZ LA SOURIS IMMUNOCOMPETENTE

Sandrine ALBAC ( UMR 1347 Agroécologie AgroSup/INRA/uB - Pôle MERS, Dijon, France)

A. Bonnin, F. Dalle, F. Vincent, F. Bon : UMR 1347 Agroécologie AgroSup/INRA/uB - Pôle MERS, Dijon, France, D. Croisier-Bertin, S. Da Silva, D. Hayez : Vivexia

Les levures du genre *Candida* sont des agents pathogènes opportunistes responsables de candidoses invasives chez les sujets immunodéprimés, et sont associées à un taux de mortalité élevé. Elles représentent 8 à 15% des infections nosocomiales hématogènes et *Candida albicans* est l'espèce la plus fréquemment isolée en pathologie humaine.

Initialement *C. albicans* appartient à la flore **commensale intestinale, buccale et vaginale** de l'homme. Ce commensalisme résulte d'un équilibre entre les propriétés biologiques de la levure et les systèmes de défense de l'hôte. La rupture de cet équilibre chez un patient fragilisé aura pour conséquence une **colonisation intense des muqueuses** favorisant un **envahissement des cellules épithéliales**, la **translocation à travers la barrière épithéliale digestive** et la possibilité de **dissémination hématogène**.

La problématique de l'équipe porte sur une meilleure connaissance des interactions entre *C. albicans* et les cellules digestives et les objectifs sont de :

- développer différents modèles *in vitro* et *in vivo* afin de préciser les bases moléculaires et cellulaires de l'interaction de *C. albicans* avec la muqueuse digestive ;
- utiliser ces différents modèles pour identifier et caractériser les gènes et les molécules de l'hôte et de *C. albicans* jouant un rôle dans la colonisation et l'invasion de la muqueuse digestive.

Afin de caractériser la virulence de *C. albicans*, nous avons développé un modèle *in vivo* de colonisation digestive stable chez la souris adulte immunodéprimée.

La stratégie expérimentale du modèle consiste tout d'abord en une période d'alimentation en nourriture infectée par *C. albicans* suivi d'une période d'alimentation en nourriture stérile (sans levures). Des coprocultures et des sacrifices sont effectués afin de déterminer la charge fongique dans les organes et le tube digestif.

Nos premiers résultats ont montré la présence de levures dans les organes comme le foie et les reins chez la souris immunocompétente. Il y a donc eu une dissémination digestive due à un inoculum trop élevé ;

Nos prochaines études porteront sur l'utilisation d'un inoculum plus faible à  $10^5$  levures par gramme de nourriture, ainsi que sur la rupture de l'équilibre hôte / agent pathogène par immunosuppression afin de d'observer une translocation des levures colonisantes à partir du tube digestif ;

Ce modèle sera par la suite utilisé afin de réaliser une étude sur la virulence de différentes souches cliniques (souches septicémiques, souches colonisantes et souches commensales) et sur différents mutants de *C. albicans* (banque de 600 mutants Knock-out et de surexpression de gènes impliqués dans la filamentation, l'adhérence, l'invasion de la levure).

[P2]

## ROLE OF TIGHT JUNCTIONS DURING INVASION OF THE INTESTINAL CELL LINE CACO-2 BY *CANDIDA ALBICANS*

Marianne Goyer<sup>1,2</sup>, Alain Bonnin<sup>1,2</sup>, Frédéric Dalle<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>. UMR 1347 Agroécologie AgroSup/INRA/uB - Pôle MERS

<sup>2</sup>. Laboratoire Parasitologie-Mycologie, CHU Dijon

*Candida albicans* is a commensal yeast of the mucous membranes in healthy humans. It can also be responsible for disseminated candidiasis mainly originating from the digestive tract in immuno-compromised patients. Deciphering the cellular and molecular mechanisms of the interaction of *C. albicans* with enterocytes is necessary to better understand the basis of commensalism and pathogenicity of this yeast and to improve the management of disseminated candidiasis due to *C. albicans*.

In intestinal epithelia, E-cadherin is constitutive of the Adherens Junctions localized just below the Tight Junctions (TJs) which ensure impermeability of the intestinal barrier. We hypothesized the absence of endocytosis of *C. albicans* in enterocytes could result from inaccessibility of *C. albicans* to E-cadherin blocked by TJs.

We conducted experiments aimed at studying the kinetics of TJs formation in parallel with invasion of the intestinal cell line Caco-2 by *C. albicans*. The protective role of the TJs in intestinal cells was also investigated, studying invasion of *C. albicans* in either non differentiated enterocytes (*i.e.* without TJs) or differentiated Caco-2 cells with chemically altered TJs. Enterocytes were further treated with endocytosis inhibitors in order to determine whether accessibility of *C. albicans* to E-cadherin in Caco-2 cells could trigger endocytosis of the yeast.

Then, we have demonstrated that TJs have a protective role in epithelial intestinal Caco-2 cells against invasion by *Candida albicans* but facilitation of access to Adherens Junctions did not lead to endocytosis of the yeast although increased invasion of *Candida albicans* was observed.

[P3]

## **Development of an improved *in vitro* model of human intestinal follicle associated epithelia to study cellular and molecular interactions of *Candida albicans* with M cells**

Carolina López Alayón

*Candida albicans* is a commensal inhabitant of the human mucosa causing harmful invasive infections in immuno-compromised patients, taking origin mainly from the gastro-intestinal tract. A better understanding of the mechanisms by which *C. albicans* interacts with the intestinal mucosa will improve our knowledge of the physiopathology of disseminated candidiasis. *C. albicans* can grow upon mucosal surfaces in both yeast and hyphal forms, the transition from the yeast to the hyphal form playing a key role in its virulence. Mucosal immunity contributes to both commensalism and pathogenicity of the fungus, possibly through presentation of *C. albicans* antigens to the underlying organized lymphoid structures via transcytosis, mediated by the specialized epithelial M cells. With this aim, we developed an *in vitro* model of the human intestinal Follicle Associated Epithelium (FAE) where enterocytes of the Caco-2 cell line in close contact with mucosal lymphocytes differentiate in M cells.

Studying adherence, invasion and translocation of *C. albicans* across co-cultures suggest that *C. albicans* interacts differentially with M cells / enterocytes co-cultures as compared to monolayers of Caco-2 cells alone. The uptake mechanism allowing *C. albicans* to translocate across the co-culture model is under investigation. Moreover, the respective contribution of the yeast and hyphal forms to this process will be studied using KO mutants of *C. albicans* unable to produce hyphae. Finally the cytokine production resulting from *C. albicans* and M cells / Caco-2 co-cultures interaction will be studied.

[P4]

## Development of a High Throughput Cytotoxicity Assay of Caco-2 Cells using a *Candida albicans* Homozygous Deletion Library

F. Vincent<sup>1</sup>, S. Znaidi<sup>2</sup>, M. Sautour<sup>1</sup>, C. Truntzer<sup>3</sup>, C. D'Enfert<sup>2</sup>, F. Dalle<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UMR 1347 Agroécologie AgroSup/INRA/uB - Pôle MERS, Dijon, France; <sup>2</sup>Unité Biologie et Pathogénicité Fongiques - INRA USC2019 - Institut Pasteur, Paris, France; <sup>3</sup>Plateforme protéomique CLIPP - CHU Dijon, Dijon, France.

**Introduction:** The opportunistic yeast *Candida albicans* gains access to the bloodstream mainly through translocation across the intestinal barrier. Using an *in vitro* model of interaction with the enterocytic-like cell line Caco-2, it has been shown that *C. albicans* is capable of adhering to, invading and damaging intestinal cells, probably through a combination of phenotypic properties including adherence, yeast to hyphae transition and secretion of lytic enzymes (Dalle *et al.*, Cell. Microbiol. 12:248, 2010). However the sequence of events together with the genes involved in these processes remain to be clarified.

The aim of our study was to screen a *C. albicans* isogenic collection of homozygous knock-out strains for genes involved in the infectivity of enterocytes using a Caco-2 *in vitro* model

**Methods:** A high throughput screening tool adapted from our Caco-2 model was used for testing the infectivity of 674 *C. albicans* homozygous deletion strains (equivalent to ~ 11% of the genome, Noble *et al.*, Nat. Genet. 42:590, 2010). Infectivity was measured as the cytotoxic effect of individual mutants upon Caco-2 cell monolayers. For each of the mutants tested, cytotoxicity was expressed as the percentage of variation as compared to the *C. albicans* SC5314 reference strain.

**Results:** We identified 66 mutants out of 674 with marked increase or decrease in Caco-2 cell cytotoxicity. These mutants were selected as the 10% fraction of the population lying in the tails of the Gaussian distribution, with 5% on each side of the distribution. A gene ontology term analysis of the 66 ORFs showed functional enrichment of genes involved in filamentous growth (p-value of 0.07, false discovery rate of 0%) among the 674 ORFs tested. An additional screen of independent mutants for these 66 genes is currently under investigation to confirm these observations.

**Conclusions:** Our study demonstrated the potential of our screen to identify genes involved in *C. albicans* ability to cause enterocyte cell damage. Known genes and yet uncharacterized ORFs have been identified for which deletion increases or decreases *C. albicans* virulence *in vitro*. Further studies will be conducted to confirm the involvement of these genes or ORFs in *in vivo* models of disseminated candidiasis originating from the gastrointestinal tract.

**THEME 2 :**

**Adaptation – Biodiversité  
des microorganismes dans leurs environnements**

## Distribution spatiale de la diversité microbienne des sols à l'échelle du territoire national

Nicolas Chemidlin Prévost-Bouré & Lionel Ranjard

Le sol représente un exceptionnel réservoir de biodiversité microbienne tant en termes d'abondance et de richesse spécifique, qu'en termes de fonctions et de processus impliqués dans les flux de matière et d'énergie. Ce réservoir assure et supporte de nombreux services écosystémiques à la base de la durabilité des systèmes de production exploités par l'Homme. Cette grande biodiversité lui confère des capacités d'adaptation (résistance, résilience, redondance fonctionnelle,...) face aux activités anthropiques et aux changements globaux, et constitue ainsi une véritable assurance écologique pour l'Homme et ses moyens de production. Néanmoins, de nombreuses connaissances restent encore à acquérir dans le domaine de l'écologie microbienne des sols et notamment en intégrant les échelles larges d'investigation, tant du point de vue spatial que temporel. L'identification et la hiérarchie des filtres environnementaux déterminant la structure des communautés microbiennes et les processus de diversification impliqués constituent un enjeu primordial pour identifier des leviers de gestion des communautés microbiennes et conserver les capacités d'adaptation et de résilience des sols basées sur cette biodiversité.

Les approches biogéographiques constituent un atout majeur pour atteindre ces objectifs. Ces approches à des échelles spatiales larges (paysage au continent) ont été appliquées avec succès aux macroorganismes pour identifier et comprendre les filtres environnementaux et les processus à l'origine de leur diversification. Au cours des dernières années, il a été démontré que de telles approches étaient applicables aux microorganismes mais peu d'études de biogéographie microbiennes étaient disponibles pour les sols à des échelles allant du paysage au continent. Dans ce contexte, le projet ECOMIC-RMQS (ANR, ADEME 2006-2010, coord. L. Ranjard) visait à caractériser les communautés bactériennes des sols du Réseau de Mesure de la Qualité des Sols à l'échelle de la France au travers de leur distribution spatiale en terme d'abondance et de diversité ; d'identifier et hiérarchiser les filtres environnementaux impliqués dans leurs variations ; et d'évaluer les processus de diversification au travers de la relation « aire-espèces ». L'application d'outils d'écologie moléculaire aux 2200 sols du RMQS (représentatifs de la diversité pédoclimatique des sols français et de leurs modes d'usage) a permis de mettre en évidence le rôle prépondérant des filtres locaux (occupation des sols et caractéristiques physico-chimique : pH, texture, teneur en C, ...) par rapport à des filtres distaux (climat, géomorphologie,...) dans le déterminisme de l'abondance et la structuration des communautés bactériennes du sol. L'étude de la relation "aire-espèces" a quand à elle permit de mettre en évidence l'existence de processus de diversification pour les communautés bactériennes du sol, processus dont l'intensité est fonction de la diversité et de la structuration spatiale des paysages. L'utilisation des sols par l'Homme et les choix de gestion réalisés sont donc à même de moduler l'assurance écologique fournie par les sols en impactant les communautés microbiennes du sol, et leurs capacités à s'adapter aux changements globaux. A l'avenir, il sera nécessaire d'identifier si ces capacités d'adaptation sont déterminées par les mêmes filtres à d'autres échelles spatiales et de les caractériser au travers d'études considérant des échelles de temps longue afin de confirmer et même prédire les évolutions de la qualité biologique de sols et donc la durabilité des pratiques avec des résultantes sur les services écosystémiques à fournir pour le bien être des sociétés humaines..

## Rôle clé de l'ergostérol dans la survie des levures aux perturbations hydriques

S. Dupont<sup>a</sup>, P. Gervais<sup>a</sup>, et L. Beney<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Université de Bourgogne/Agrosup Dijon – UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques –  
Equipe Procédés Microbiologiques et Biotechnologiques - Dijon  
sebastien.dupont@u-bourgogne.fr

Les stérols, de par leurs importantes fonctions structurales et de signalisation, sont des lipides membranaires essentiels de la plupart des cellules eucaryotes. Ils sont représentés par le cholestérol chez les vertébrés, les phytostérols chez les plantes, et l'ergostérol chez les champignons. La spécificité des stérols dans chaque règne eucaryote pourrait être liée à l'évolution biologique, mais l'origine de la différenciation reste inconnue. En particulier, la raison pour laquelle l'ergostérol a été sélectionné chez les champignons n'est pas élucidé puisque sa synthèse nécessite plus d'énergie que celle du cholestérol<sup>1</sup> et les études structure-fonction n'ont pas réussi à montrer un avantage de l'ergostérol par rapport à cholestérol<sup>1,2</sup>. Nous avons émis l'hypothèse que l'origine de la voie de biosynthèse de l'ergostérol (VBE) pourrait être liée aux spécificités de la vie des champignons. Les champignons sont particulièrement bien adaptés aux habitats interfaciaux (surfaces des sols, végétaux et animaux), où ils subissent de fréquentes fluctuations hydriques. Comme l'ergostérol est connu pour augmenter la résistance mécanique des cellules à déshydratation<sup>3,4</sup>, nous avons émis l'hypothèse que la VBE pourrait avoir été sélectionnée sous la pression des contraintes causées par des cycles de déshydratation/réhydratation. Pour cela, les taux de survie de mutants de *Saccharomyces cerevisiae* sur la VBE, accumulant différents stérols intermédiaires, ont été comparés après une transition d'un milieu liquide vers un milieu aérien. Les résultats montrent que la progression dans la VBE permet l'augmentation de la résistance au séchage à l'air avec un taux de survie maximal pour la souche sauvage<sup>5</sup>. Lorsque le cycle séchage/réhydratation a été réalisé sous azote, la survie des différentes souches est plus élevée, en particulier pour les mutants précoces de la VBE. En conclusion, la survie des levures aux perturbations hydriques est liée à la présence de l'ergostérol. Ce composé essentiel, spécifique de la membrane des champignons, augmente la résistance au stress osmotique mais aussi à l'oxydation induite par l'évaporation de l'eau et l'exposition directe à l'air atmosphérique. Par conséquent, l'évolution de la VBE a peut-être été un élément clé dans la conquête des niches écologiques situées au contact direct de l'atmosphère par des champignons. Cette étude fournit un élément de réponse à la question : "Pourquoi l'ergostérol chez les champignons ?"<sup>1</sup>. Les applications attendues à partir de cette découverte concernent l'optimisation des méthodes de préservation des cellules eucaryotes impliquant la déshydratation, mais également le développement de nouvelles stratégies pour la destruction des champignons pathogènes impliqués dans de nombreuses activités de dégradation des aliments.

### Références :

1. Parks, L. W. & Casey, W. M. Physiological implications of sterol biosynthesis in yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 95-116 (1995).
2. Shrivastava, S. & Chattopadhyay, A. Influence of cholesterol and ergosterol on membrane dynamics using different fluorescent reporter probes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 356, 705-10 (2007).
3. Dupont, S., Beney, L., Ferreira, T. & Gervais, P. Nature of sterols affects plasma membrane behavior and yeast survival during dehydration. *Biochim. Biophys. Acta* 1808, 1520-8 (2011).
4. Dupont, S., Beney, L., Ritt, J. F., Lherminier, J. & Gervais, P. Lateral reorganization of plasma membrane is involved in the yeast resistance to severe dehydration. *Biochim. Biophys. Acta* 1798, 975-85 (2010).
5. Dupont, S., Lemetais, G., Ferreira, T., Cayot, P., Gervais, P. & Beney, L. Ergosterol biosynthesis: a fungal pathway for life on land? *Evolution* (In press).

## **Relation adaptation - fonctionnalité des bactéries lactiques dans les aliments**

Stéphanie Weidmann

*UMR PAM-équipe VALMIS, IUVV, 1, rue Claude Ladrey, 21078 Dijon Cedex,*

Les bactéries lactiques constituent un groupe important de bactéries à Gram + qui sont trouvées dans des environnements divers tels que l'Homme, les animaux, les végétaux. Ces bactéries, de part leurs propriétés acidifiantes, aromatisantes et texturantes, sont exploitées dans l'élaboration de nombreux produits fermentés dérivés de l'animal (lait, viande, poisson...) ou des plantes (légumes, vins, olives...). Elles sont également utilisées dans diverses applications biotechnologiques (biopréservation, bio-vaccins) et des applications probiotiques (compléments alimentaires, aliments fonctionnels).

Dans les aliments, au niveau des phases de préparation et des phases de conservation, les bactéries lactiques sont soumises à des changements des conditions physico-chimiques. Ces stress peuvent conduire à une perte de viabilité et par conséquent à une diminution de leur fonctionnalité. Pour résister à ces stress, les bactéries doivent préserver l'intégrité de leur matériel cellulaire comme l'ADN, les protéines et la barrière semi-perméable que constitue la membrane cytoplasmique. De nombreux mécanismes d'adaptation ont été décrits qui sont souvent universels. Cependant selon les espèces considérées les capacités de survie peuvent faire appel à des mécanismes qui leur sont propres.

L'accumulation d'acide et notamment d'acide lactique issu des fermentations est un obstacle au maintien de la viabilité. Cependant d'autres stress peuvent également être prépondérant dans certains aliments, comme par exemple un stress oxydatif, et pour certains aliments comme les boissons fermentées la présence d'éthanol. Dans ces milieux défavorables, ces bactéries sont capables de s'adapter afin d'exercer leur métabolisme. Ainsi, elles mettent en jeu plusieurs processus moléculaires et physiologiques parmi lesquels la régulation du pH intracellulaire, la régulation de la fluidité membranaire et la synthèse de protéines de stress limitant l'agrégation des protéines cellulaires jouent un rôle majeur.

La compréhension des mécanismes mis en jeu dans la résistance au stress de ces bactéries est cruciale pour maîtriser leur utilisation au niveau industriel.

## **Adaptation de *Candida albicans* dans les tissus humains : du commensalisme à la pathogénicité.**

F Vincent, F Bon, M Sautour, C L'Ollivier, M Goyer, C Lopez, S Albac, PE Charles, D Croisier, A Hartmann, A Bonnin & F Dalle

UMR 1347 Agroécologie AgroSup/INRA/uB - Pôle MERS

*Candida albicans* (*C. albicans*) est un micro-organisme eucaryote appartenant à la flore commensale des muqueuses de l'homme sain. Ce commensalisme résulte d'un équilibre entre la levure et les systèmes de défense de l'hôte. La rupture de cet équilibre chez un patient fragilisé (sujet infecté par le VIH, neutropénique, cancéreux, transplanté ou séjournant en service de réanimation) favorisera une colonisation intense des muqueuses, un envahissement de la barrière digestive et enfin la possibilité de dissémination hématogène. Les candidémies restent des infections graves puisque la mortalité directement attribuable à l'infection est estimée à 38%.

Nos travaux ont d'abord porté sur la caractérisation génotypiques de souches cliniques invasives et colonisantes isolées chez des patients du CHU de Dijon, et de souches commensales. L'objectif de ces études était de préciser si les différents environnements rencontrés par *C. albicans* d'une part chez le sujet sain et d'autre part chez le sujet fragilisé, pouvaient conditionner l'existence préférentielle de certaines sous populations de *C. albicans*. Ces travaux ont permis de montrer que les différentes sous-populations de *C. albicans* possédaient (i) la même capacité à survivre comme agent commensal au niveau des muqueuses de l'homme et (ii) le même potentiel de pathogénicité. Ces données confortent ainsi le concept selon lequel le devenir de *C. albicans* est conditionné par la nature de l'environnement rencontré chez son hôte.

Puisque la translocation à travers la muqueuse intestinale est la porte d'entrée au cours de la majorité des candidoses septicémiques, nous avons abordé l'étude de la réactivité de la cellule hôte entérocytaire au cours de l'interaction avec *C. albicans*, afin de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires permettant le maintien de la levure à l'état commensal en surface des muqueuses intestinales ou sa translocation à travers la barrière digestive. Ces travaux ont déjà montré que le type cellulaire épithélial joue un rôle important dans la nature de l'interaction avec *C. albicans* et notamment que la barrière entérocytaire exerce un rôle protecteur contre l'invasion par *C. albicans*. De plus cette protection tissulaire semble médiée en partie par les jonctions inter-cellulaires « serrées » présentes au niveau des entérocytes.

Des travaux sont en cours visant à préciser les bases moléculaires du maintien de *C. albicans* à l'état commensal en surface des muqueuses digestives. De plus, par des approches de screening à moyen débit de souches cliniques et de mutants de *C. albicans* dans un modèle *in vitro* d'interaction avec l'entérocyte, des études sont en cours qui permettront de préciser les gènes de *C. albicans* impliqués dans le commensalisme d'une part, et dans la pathogénicité d'autre part, au niveau des muqueuses digestives. A ce titre, un modèle de colonisation digestive chez la souris immunocompétente a été développé dans notre laboratoire afin de confirmer/infirmer les données observées *in vitro*.

Enfin, afin de mieux comprendre les facteurs qui régissent l'adaptation de *C. albicans* à son environnement, nous avons initié une série de travaux visant à mieux comprendre l'instabilité de sa survie dans les sols. En effet, mieux comprendre les facteurs délétères à sa survie dans un environnement « hostile » permettra aussi de préciser les bases du commensalisme de *C. albicans* chez l'homme.

## L'ASSURANCE ECOLOGIQUE EST-ELLE APPLICABLE AUX COMMUNAUTES MICROBIENNES TELLURIQUES ?

V. TARDY <sup>a</sup>, O. MATHIEU <sup>b</sup>, J. LEVEQUE <sup>b</sup>, P. LEMANCEAU <sup>a</sup>, L. RANJARD <sup>a</sup> et P. A. MARON <sup>a</sup>.

<sup>a</sup> INRA, UMR1347 Agroécologie, BP 86510, F-21000 Dijon, France

<sup>b</sup> Université de Bourgogne, UMR Biogéoscience 5561, UFR Science Terre & Environnement, 6 Bd Gabriel, F-21000 Dijon, France

[vincent.tardy@dijon.inra.fr](mailto:vincent.tardy@dijon.inra.fr)

Les activités anthropiques telles que le changement d'occupation des sols et l'industrialisation ont conduit à une diminution importante de la biodiversité à l'échelle mondiale. Face à cette érosion, la compréhension de la relation entre la biodiversité et le fonctionnement des écosystèmes a suscité depuis ces dernières années un intérêt croissant dans les sciences environnementales et écologiques. En 1999, Yachi et Loreau développent le concept d'assurance écologique selon laquelle une forte diversité d'espèces dans un écosystème conduit à une meilleure stabilité des communautés suite à une perturbation qui par conséquent, assure le maintien des fonctions essentielles de l'écosystème. Cette relation entre diversité-stabilité-fonction a largement été étudiée chez les végétaux mais reste encore inconnue chez les microorganismes du sol.

Dans ce contexte, nous avons étudié l'impact d'une érosion artificielle de biodiversité sur la stabilité (i.e. la résilience et la résistance par rapport à une perturbation) structurale et fonctionnelle des communautés microbiennes en réponse à deux perturbations de nature différente : un stress métallique (rémanent) et un stress thermique (non rémanent). L'érosion de diversité microbienne a été obtenue par inoculation de microcosmes de sol stérile avec différentes dilutions de suspension d'un sol de prairie (ORE Lusignan). La réponse au stress des communautés microbiennes (bactéries et champignons) a été évaluée par un suivi de la densité et de la structure génétique, mais aussi par un suivi de la cinétique de dégagement de CO<sub>2</sub> du à la minéralisation du carbone du sol. Nos résultats montrent un impact significatif du niveau de diversité sur la résistance et la résilience fonctionnelle et structurale des communautés aux perturbations impliquées. Cette étude illustre donc l'importance écologique de la diversité taxonomique microbienne tellurique dans les capacités d'un sol à maintenir la fourniture des services écosystémiques dans des conditions environnementales fluctuantes.

Yachi, S., Loreau, M., 1999. Biodiversity and ecosystem productivity in a fluctuating environment: The insurance hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 1463-1468.

## **Influence of abiotic and biotic soil characteristics on *Listeria monocytogenes* survival in the environment**

Aude LOCATELLI, Aymé SPOR, Pascal PIVETEAU, Alain HARTMANN

*UMR 1347 Agroécologie*

*Listeria monocytogenes* is a food born pathogen responsible for the potentially fatal disease listeriosis. Initial contamination of plants vegetables and fruits may occur in cropping systems and originate from soil (that may act as a reservoir), water or organic amendments. The aim of this study was to identify major biotic and abiotic soils characteristics which determine *L. monocytogenes* survival in soil. Survival of *L. monocytogenes* was evaluated in a set of 100 soil microcosms representative of land use and pedology of French soils. These soils originated from the RMQS network were thoroughly characterized including chemical properties (pH, ionic content), texture (clay, sand and silt content), land use, and spatial localization.

A sub-set of 9 Gamma-radiation sterilized soils was used to investigate whether soil microflora may affect *L. monocytogenes* survival. Microcosms were inoculated with  $10^6$  *L. monocytogenes* per gram of soil. *L. monocytogenes* populations were monitored after 7, 14 and 84 days of incubation at 20°C by plate-counts on selective PALCAM media. *L. monocytogenes* was able to persist in most of the tested soils but survival rates were strongly variable. A short term and a long term survival of *L. monocytogenes* were reported in 71% and 21% of tested soils, respectively. In 8% of soils, *L. monocytogenes* was either absent or below detection limits as soon as 7 days after inoculation. This suggests that *L. monocytogenes* survival depends on abiotic and/or biotic factors. Statistical analysis evidenced that land use and spatial localization of soils did not significantly affect *L. monocytogenes* survival. Variance partitioning demonstrated that 60% of the differences between survival rates at 7 and 14 days were explained by soil chemical properties. Basic cation saturation ratio was the major soil chemical characteristic explaining short-term survival. Cationic exchange capacity and exchangeable calcium further explained survival of *L. monocytogenes* at 7 days and 14 days respectively. Long-term survival was driven mainly by soil texture (11% of the variance), especially clay content. Survival of *L. monocytogenes* in sterile soils differed markedly. Indeed, 4 sterilised soils supported growth of *L. monocytogenes* while the rate of decrease was lower in the other sterilised soils than when microflora was active. This result points out the critical role played by both the soil microflora and the soil physico-chemical properties in determining the survival rate of *L. monocytogenes*.

## Influence du système de sécrétion de type III bactérien dans les interactions plantes-*Pseudomonas* spp. fluorescents non pathogènes

A. Viollet, T. Corberand, C. Mougél, L. Avoscan, G. Vansuyt, P. Lemanceau et S. Mazurier  
UMR 1347 Agroécologie AgroSup/INRA/uB

L'objectif de cette thèse a été de contribuer à faire progresser les connaissances sur les interactions bénéfiques entre les plantes et les microorganismes en évaluant la contribution des systèmes de sécrétion de type III (SST3). Une synthèse des connaissances disponibles relatives aux SST3 chez les *Pseudomonas* non pathogènes, saprotrophes ou mutualistes, montre que les SST3 ne sont pas cantonnés aux interactions parasites ou pathogènes avec les plantes. Dans la **première étude** expérimentale, nous avons utilisé différents génotypes de *Medicago truncatula* Gaertn. cv. Jemalong capables (Myc+) ou non (Myc-) d'établir une symbiose mycorhizienne. Ce travail nous a permis de montrer que les *Pseudomonas* spp. fluorescents possédant un SST3 (SST3+) sont préférentiellement associés aux racines mycorhizées des génotypes Myc+ de *M. truncatula* (J5 et TRV48) plutôt qu'aux racines du mutant Myc- (TRV25) et au sol nu. Ainsi, la plante seule n'est pas à l'origine de la présence accrue des *Pseudomonas* SST3+. La colonisation de la racine par les champignons mycorrhizogènes à arbuscules (CMA), le développement du mycélium intraradiculaire et/ou la formation associée d'arbuscules, sont également déterminants. Dans la **seconde étude**, nous avons comparé les effets de la souche modèle promotrice de mycorhization (MHB) *P. fluorescens* C7R12 (SST3+) et de son mutant C7SM7 (SST3-), sur la mycorhization et la croissance de *M. truncatula* dans un sol non stérile. Ce travail a permis de montrer que le SST3 de C7R12 contribue à l'effet MHB de la bactérie. La promotion de la colonisation de la racine de *M. truncatula* par les CMA indigènes induite par le SST3 de C7R12 s'est traduite par une amélioration de la croissance de la plante. En revanche, l'inactivation du SST3 chez C7SM7 a eu un impact délétère sur la colonisation de la racine de *M. truncatula* par les CMA du sol étudié et sur la croissance de la plante. L'observation d'effets quantitatifs opposés entre C7R12 et C7SM7, nous a conduits à nous interroger sur l'existence d'un effet différentiel de l'inoculation de ces bactéries sur la structure et la diversité des communautés des microorganismes associés. Dans la **troisième étude**, le suivi dynamique en parallèle de la structure des communautés totales bactériennes (B-RISA) et fongiques (F-RISA) et de la colonisation de la racine par les CMA a été réalisée. Aucun effet de l'inoculation n'a été observé sur la structure des communautés fongiques de la rhizosphère ou des racines. En revanche, la structure des communautés bactériennes a varié selon que les plantes aient été inoculées ou non et selon la souche inoculée. Néanmoins, ces différences ont été observées plusieurs semaines après les effets de l'inoculation de C7R12 ou de C7SM7 sur la colonisation de la racine par les CMA. Ce décalage dans le temps, suggère que les différences observées dans la structure des communautés bactériennes pourraient être une conséquence plutôt qu'une cause des variations observées sur la mycorhization de *M. truncatula*. Nos résultats n'ont pas permis de mettre en évidence d'effets de l'inoculation sur la diversité des populations des bactéries fixatrices d'azote présentes dans les nodosités de *M. truncatula*. L'analyse des séquences de la grande sous-unité de l'ADN ribosomique (LSU rDNA) amplifiées à partir d'ADN extrait des racines, a montré pour les plantes inoculées et non inoculées, que les populations de CMA étaient majoritairement apparentées à *Glomus intraradices*. Un groupe d'isolats spécifiquement associé aux racines inoculées avec C7R12 et apparenté à *G. claroideum* a été décrit. Le groupe spécifique pourrait être associé à l'amélioration de la mycorhization observée dans les racines inoculées avec C7R12. Néanmoins, compte tenu de sa faible représentation numérique (8%), il semble probable que l'inoculation de C7R12 ait aussi un effet quantitatif sur la colonisation de la racine de *M. truncatula* par les CMA. Les SST3 des *Pseudomonas* phytopathogènes sont connus pour modifier les mécanismes de défense de la plante et permettre une meilleure colonisation de l'hôte par les bactéries. Nous avons donc émis l'hypothèse selon laquelle le SST3 de C7R12 pourrait favoriser la colonisation des racines par les CMA en modifiant les réactions de défense de la plante et être impliqué dans la capacité de vie endophyte de la bactérie. Les résultats préliminaires de la **quatrième étude**, ont montré que C7R12 présente effectivement une meilleure aptitude à la vie endophyte que son mutant SST3-. La comparaison de la colonisation de la racine par C7R12 et C7SM7 à l'aide des observations microscopiques, n'a pas permis de confirmer les premiers résultats obtenus par dénombrement. Néanmoins, les études en microscopie n'ont concerné qu'une partie réduite de la racine et devront être complétées.

**Mots clés :** système de sécrétion de type III, *Pseudomonas* spp. fluorescents, mycorrhiza helper bacteria (MHB), *Medicago truncatula*, champignons mycorrhizogènes à arbuscules, interactions plantes-microorganismes bénéfiques

## Optimisation du pyroséquençage haut-débit pour caractériser la diversité taxonomique des communautés bactériennes des sols.

S. TERRAT<sup>a</sup>, P. PLASSART<sup>b</sup>, R. CHRISTEN<sup>c</sup>, S. DEQUIEDT<sup>a</sup>, T. REGNIER<sup>b</sup>, M. LELIEVRE<sup>a</sup>, V. NOWAK<sup>b</sup>, P. LEMANCEAU<sup>b</sup>, P.A. MARON<sup>a,b</sup>, C. MOUGEL<sup>a,b</sup> et L. RANJARD<sup>a,b</sup>

*a* INRA, UMR1347 Agroécologie, Plateforme GenoSol, BP 86510, F-21000 Dijon, France

*b* INRA, UMR1347 Agroécologie, BP 86510, F-21000 Dijon, France

*c* Laboratoire de Biologie virtuelle (UMR CNRS 6543), Université de Nice, 06300 NICE

[sebastien.terrat@dijon.inra.fr](mailto:sebastien.terrat@dijon.inra.fr)

La diversité microbienne d'un sol (que l'on estime à 100000 à 1000000 d'espèces différentes par gramme de sol) est difficile à caractériser. Toutefois, d'importantes avancées en biologie moléculaire (comme le développement du pyroséquençage), ont permis d'obtenir plusieurs centaines de milliers de séquences à partir d'un ADN méta-génomique, permettant une meilleure caractérisation de la diversité des communautés microbiennes du sol. Toutefois, dans un contexte où l'écologie microbienne du sol commence à s'accaparer les échantillonnages de grande envergure (spatial et temporelle) afin de mieux hiérarchiser les processus et paramètres impliqués dans la diversification de ces communautés il est nécessaire d'identifier tous les biais méthodologiques qui peuvent entraîner une faible robustesse et représentativité des résultats obtenus.

Il est ainsi indispensable de réévaluer l'efficacité et la reproductibilité du protocole d'extraction d'ADN de sol en fonction des pré requis liés au pyroséquençage des gènes taxonomiques (Terrat et coll., 2011). Il est également essentiel de déterminer la profondeur de séquençage nécessaire pour obtenir une bonne estimation de la diversité des communautés bactériennes des sols étudiés. Enfin, le multiplexage des échantillons, via l'utilisation de TAG, nécessite l'évaluation des biais que peut entraîner l'introduction de ces séquences. Ces premières études nous ont permis d'évaluer les différents biais que peuvent entraîner l'usage du pyroséquençage pour étudier la diversité taxonomique microbienne des sols. Au final, ces informations nous permettront de caractériser au mieux la diversité taxonomique des microorganismes du sol, et de l'appliquer en moyen débit sur les réseaux de surveillance des sols ou sur des chronoséquences (Ranjard et coll., 2009-2010).

Terrat S, Christen R, Dequiedt S, Lelievre M, Nowak V, Bachar D, Plassart P, Wincker P, Jolivet C, Bispo A, Lemanceau P, Maron PA, Mougel C, Ranjard L. 2011. Pyrosequencing of Bacterial rrs as Influenced by Soil DNA Extraction Procedure. *Applied and Environmental Microbiology*. (submitted).

Ranjard L, Dequiedt S, Jolivet C, Saby NPA, Thioulouse J, Harmand J, Loisel P, Rapaport A, Fall S, Simonet P, Joffre R, Chemidlin-prévost Bouré N, Maron PA, Mougel C, Martin MP, Toutain B, Arrouays D, Lemanceau P. 2010. Biogeography of Soil Microbial Communities: a Review and a Description of the Ongoing French National Initiative. *Agronomy for Sustainable development*. 30-2 : 359-365.

Ranjard L, Dequiedt S, Lelievre M, Maron PA, Mougel C, Morin F, Lemanceau P. 2009. Platform GenoSol: a new tool for conserving and exploring soil microbial diversity. *Environmental Microbiology Report*. 1: 97-99.

## Relation entre l'oligomérisation de la protéine de stress Lo18 de la bactérie *Oenococcus oeni* et son activité de stabilisation de substrats protéiques et lipidiques

M. Maitre<sup>a</sup>, S. Weidmann<sup>a</sup>, A. Rieu<sup>a</sup>, D. Fenel<sup>b</sup>, G. Schoehn<sup>b</sup>, C. Ebel<sup>b</sup>, J. Covès<sup>b</sup>, J. Guzzo<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> UMR PAM - équipe VALMIS – IUVV - Dijon

<sup>b</sup> UMR 5075, CNRS-CEA-UJF - Institut de Biologie Structurale - Grenoble  
magali.maitre@u-bourgogne.fr

*Oenococcus oeni* est une bactérie lactique responsable de la fermentation malolactique des vins. Afin de se développer et d'exercer ses propriétés métaboliques dans cet environnement hostile (caractérisé entre autre par son pH bas, ses taux d'éthanol et de sulfites élevés et sa température faible) *O. oeni* doit mettre en place des mécanismes de résistance au stress. Un de ces dispositifs clés est sa capacité à synthétiser une protéine de réponse au stress (sHsp) nommée Lo18. Cette protéine, dont la synthèse est induite par de multiples stress, possède (i) une activité de chaperon moléculaire empêchant l'agrégation des protéines cytoplasmiques et (ii) une activité de stabilisation des membranes cellulaires appelée activité lipochaperon.

Pour exercer leurs activités de manière optimale, les sHsp doivent s'assembler en structures quaternaires dynamiques. Cette étude a pour but de caractériser l'état oligomérique de la protéine Lo18 et d'établir une relation entre sa structure et ses fonctions *in vitro*. Des modifications des conditions physico-chimiques du milieu ont permis de faire varier le niveau d'oligomérisation de Lo18. Les structures quaternaires obtenues ont été analysées par tamisage moléculaire et ultracentrifugation analytique. Une étude plus approfondie réalisée par microscopie électronique nous a permis d'obtenir une image basse résolution de la protéine qui suggère que la structure de base nécessaire à l'oligomérisation de Lo18 est un dimère. Pour chaque pH testé, l'activité de chaperon moléculaire sur une protéine modèle (la citrate synthase) et l'activité de lipochaperon sur des vésicules lipidiques ont été évaluées. Les résultats obtenus montrent une corrélation entre la forme oligomérique et les activités de la protéine Lo18 et mettent en évidence la nécessité d'une dynamique structurale afin que la protéine puisse exercer ses activités.

Actuellement, peu de données sont disponibles sur le mode d'action des sHsp au niveau membranaire. Ainsi, afin d'appréhender le mécanisme d'action de Lo18 avec la membrane cytoplasmique de *O. oeni*, nous avons recherché les substrats lipidiques préférentiels de cette protéine. Des vésicules lipidiques ont été constituées à partir de phospholipides extraits de la membrane de *O. oeni* cultivé dans différentes conditions de stress, ou à partir de phospholipides artificiels. La capacité de Lo18 à moduler la fluidité de ces différentes vésicules a été étudiée par la technique d'anisotropie de fluorescence, permettant ainsi de conclure sur l'interaction entre Lo18 et les phospholipides. Ces résultats s'inscrivent dans une démarche plus large de compréhension de la réponse au stress chez *O. oeni* dans le but d'améliorer sa croissance en milieu vin et d'optimiser l'étape de fermentation malolactique.

## Utilisation d'un rotor moléculaire pour une meilleure compréhension des structures hydrophobes de la spore bactérienne

P. Loison<sup>a</sup>, N. A. Hosny<sup>b</sup>, P. Gervais<sup>a</sup>, D. Champion<sup>a</sup>, M. Kuimova<sup>b</sup> and J.-M. Perrier Cornet<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Université de Bourgogne/Agrosup Dijon, UMR PAM, Dijon, France

<sup>b</sup>Imperial College London, Chemistry Department, London, U.K.  
pauline.loison@u-bourgogne.fr

Certaines espèces bactériennes, lorsqu'elles sont situées dans un environnement défavorable, ont la capacité de sporuler. Ces spores représentent une préoccupation majeure dans l'industrie alimentaire car elles sont responsables de détériorations et de maladies en raison de leur capacité à survivre face aux stress environnementaux (chaleur, rayonnement, déshydratation). Cette résistance élevée aux contraintes environnementales est due à leur structure particulière et compartimentée ainsi qu'à leurs conditions de sporulations. Les spores bactériennes possèdent de nombreuses couches : une enveloppe protéique, un cortex composé de peptidoglycane, deux membranes et le protoplasme où l'ADN est situé. La membrane externe est située entre l'enveloppe et le cortex alors que la membrane interne entoure le protoplasme. La composition de cette dernière est proche de celle d'une membrane de cellule végétative, mais elle possède des propriétés particulières: une rigidité importante et une faible perméabilité aux petites molécules. Cette faible perméabilité permet aux spores de se protéger contre certains agents chimiques et particulièrement ceux pouvant détériorer son ADN. Cependant, peu de choses sont connues sur la structure et l'organisation de cette membrane. Ceci est notamment dû à la difficulté d'obtenir des informations sur les couches internes des spores sans perturbation.

Dans le but d'étudier les couches hydrophobes des spores de *Bacillus subtilis* et en particulier la mobilité de sa membrane interne, nous proposons d'utiliser l'imagerie en temps de vie de fluorescence (FLIM) à l'aide de sondes sensibles à la viscosité. Ces fluorophores, appelés rotors moléculaires, possèdent un degré de flexibilité interne élevé. Ainsi, leur intensité d'émission et leur durée de vie sont fortement dépendantes de la viscosité de leur environnement. Ces sondes ont donc émergé comme une nouvelle méthode de mesure de microviscosités dans des milieux biologiques. Kuimova *et al.*, ont mis au point un rotor moléculaire hydrophobe (*meso*-substitué 4,4'-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene) dans lequel la durée de vie de fluorescence donne une bonne mesure de la viscosité. Ce rotor permet d'étudier un large éventail de viscosités allant de 28 à 950 cP et a déjà été utilisé pour mesurer des viscosités intracellulaires. L'utilisation du FLIM dans les spores bactériennes a permis de visualiser des viscosités différentes situées dans diverses couches de la spore. La localisation des durées de vie semble montrer que l'une des couches les plus profondes de la spore a une viscosité élevée, tandis qu'une viscosité plus faible est observée dans la périphérie. Cette viscosité élevée pourrait être attribuée à la membrane interne. Ces résultats sont encourageants et indiquent que l'utilisation de ce rotor est appropriée pour étudier la spore bactérienne. Il représente un outil puissant pour suivre l'état intérieur des spores et peut aider à une meilleure compréhension des effets de perturbations externes (comme la température ou les hautes pressions) sur les structures de la spore.

[P5]

## Comparaison de la structure bactérienne du caecum, du colon et des fèces équin par ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis)

S. Sadet-Bourgeteau<sup>a,b</sup>, C. Philippeau<sup>a,b</sup>, M. Lelièvre<sup>c</sup> et V. Julliand<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>AgroSup Dijon, F-21079 Dijon, France (*s.bourgeteau-sadet@agrosupdijon.fr*)

<sup>b</sup>INRA, USC1335 Nutrition du cheval athlète, F-21079 Dijon, France

<sup>c</sup>INRA -Université de Bourgogne, UMR Microbiologie du sol et de l'environnement  
Plateforme GenoSol, 17 rue de Sully, 21065 Dijon, France

Le cheval est un herbivore monogastrique. L'hydrolyse et la fermentation des composés fibrolytiques de la ration en acides organiques se déroulent essentiellement au niveau du gros intestin (caecum et côlon) grâce à une flore et une faune microbienne dense et diverse. Parmi les microorganismes présents à ce niveau du tractus digestif, les bactéries ont été les plus étudiées. Il est connu que des régimes alimentaires riches en concentré, distribués aux chevaux à l'exercice pour couvrir leurs besoins énergétiques « élevés », peuvent être source de dysmicrobismes au niveau du gros intestin. A long terme ces régimes peuvent engendrer l'apparition de pathologies digestives comme les coliques. Même si le lien entre modifications de la composition de la communauté bactérienne intestinale équine et apparition de pathologies digestives est fortement supposé, celui ci reste à démontrer. L'étude de ces communautés est donc essentielle pour mieux comprendre et prévenir l'apparition de pathologies digestives. Ces investigations nécessitent la collecte de contenus digestifs au niveau du caecum et du côlon. Peu d'équipes de recherche disposent de chevaux fistulisés permettant un accès au contenu du gros intestin. En l'absence d'un tel modèle, les prélèvements de contenu digestif ne peuvent se faire que par chirurgie ou abattage. Cependant ces procédés sont souvent lourds au niveau expérimental, coûteux et éthiquement peu acceptables. Ainsi, bon nombre d'équipes de recherche analysent les communautés bactériennes intestinales équines en effectuant des prélèvements de fèces et en extrapolant les résultats obtenus à l'ensemble de gros intestin.

Le but de la présente étude était d'évaluer la représentativité des fèces équin par rapport au caecum et au côlon. Pour cela la structure de la communauté bactérienne fécale a été comparée à celles du caecum et du côlon via une technique d'empreinte moléculaire : l'ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis). Quatre chevaux adultes, fistulisés au niveau du caecum et du côlon, ont été nourris avec un régime identique (75% de fourrage et 25% de concentré). Quatre heures après le repas du matin, les contenus digestifs provenant du caecum et du côlon ont été prélevés via l'ouverture des fistules, tandis que les prélèvements de fèces ont été réalisés par fouille rectale.

Quel que soit le segment digestif considéré (caecum, colon et rectum), la structure des communautés bactériennes du gros intestin était significativement différente d'un individu à l'autre ( $P < 0.05$ ). La comparaison des communautés bactériennes du gros intestin équin a mis en évidence, quel que soit le cheval considéré, que les profils obtenus pour le caecum et le côlon n'étaient pas significativement différents ( $P > 0.05$ ). En revanche, concernant la structure de la communauté bactérienne fécale, celle ci était significativement différente de celle du caecum et du côlon ( $P = 0.04$  et  $P = 0.002$ , respectivement). Nos résultats remettent en cause la représentativité des fèces. Cependant dans cette étude nous n'avons observé que la structure des communautés bactériennes dans des conditions expérimentales particulières. Afin de statuer sur la représentativité des fèces, ces résultats devront être complétés par d'autres travaux comparant, à nouveau, la structure, mais aussi la composition et l'activité enzymatique de ces communautés bactériennes dans d'autres conditions environnementales.

## Optimisation des conditions de milieu et d'environnement pour la croissance et la conservation de *Faecalibacterium prausnitzii*

C. Iaconelli<sup>a</sup>, H. Nguyen<sup>a</sup>, F. Martin<sup>a</sup>, P. Molimard<sup>b</sup>, R. Cachon<sup>c</sup>, L. Beney<sup>c</sup>, P. Gervais<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Université de Bourgogne – Welience/UMR-PAM

<sup>b</sup> Merck Medication Familiale – Dijon

<sup>c</sup> Université de Bourgogne – Agrosup Dijon/UMR-PAM

cyril.iaconelli@u-bourgogne.fr

Il existe un très grand nombre de bactéries probiotiques dont les effets étudiés sur la santé sont très nombreux depuis le rhume, les maladies cardio-vasculaires (Ebel et al.), jusqu'au syndrome de l'intestin irritable. De récentes études montrent l'importance qu'a une souche bactérienne anaérobie du colon sur la maladie de Crohn : *Faecalibacterium prausnitzii* (Sokol et al. 2008). En effet, l'absence de cette bactérie dans le microbiote est associée à une prévalence de cette maladie. *Faecalibacterium prausnitzii* et son surnageant présentent d'autre part une activité anti-inflammatoire importante qui peut être impliquée dans cette action. Ces résultats permettent d'envisager la production et la stabilisation de cette bactérie dans l'optique de réduire les symptômes des patients atteints du syndrome de l'intestin irritable.

La plupart des bactéries qui composent le microbiote intestinal sont très sensibles à l'oxygène et trouvent dans l'intestin un environnement anaérobie que l'on a encore du mal à reproduire en conditions de laboratoire.

L'objectif du travail est dans un premier temps d'étudier le microorganisme isolé du microbiote. Il s'agit de déterminer les conditions de milieu et d'environnement (environnement gazeux, potentiel rédox, pression, etc.) permettant d'optimiser sa croissance et sa conservation sous forme sèche et sous forme liquide concentré. À cette fin, quatre milieux gazeux anaérobies sont testés.

En ce qui concerne le séchage qui induit successivement un stress mécanique et un stress oxydatif au niveau membranaire (Dupont et al.), la stratégie d'optimisation consiste pour le stress mécanique à moduler l'application du stress hydrique et pour le stress oxydatif à réguler l'ajout de molécules aux propriétés antioxydantes.

Des premiers résultats montrent qu'il est possible de préserver dans certaines conditions l'intégrité de la membrane plasmique et ainsi de conserver une fraction sèche et viable de cette bactérie.

Dupont, S., Lemetais, G., Ferreira, T., Cayot, P., Gervais, P. and Beney, L. (2012), Ergosterol biosynthesis: a fungal

pathway for life on land?. *Evolution*. DOI: 10.1111/j.1558-5646.2012.01667

Ebel B, Lemetais G, Beney L, Cachon R, Sokol H, Langella P, Gervais P. Could probiotics prevent cardiovascular

diseases? A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* DOI: 10.1080/10408398.2011.579361.

Sokol H et al. 2008. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut

microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(43):16731-16736

[P7]

## **Plateforme GenoSol : une structure logistique d'appui à la recherche sur la microbiologie des sols et de l'environnement**

**S DEQUIEDT<sup>1,2</sup>, M LELIEVRE<sup>1,2</sup>, PA MARON<sup>1,2</sup>, C MOUGEL<sup>1,2</sup>, F MORIN<sup>1,2</sup>, S TERRAT<sup>1,2</sup>, C FAIVRE<sup>1,2</sup>, P LEMANCEAU<sup>1,2</sup>, L RANJARD<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>*INRA, Université de Bourgogne, UMR 1347 AgroEcologie, 17, rue Sully, B.V. 86510, 21065 Dijon Cedex France*

<sup>2</sup>*Platform GenoSol, INRA, Université de Bourgogne, 17, rue Sully, B.V. 86510, 21065 Dijon Cedex France*

Les communautés microbiennes du sol sont difficiles à caractériser. Ceci s'explique par une accessibilité plus ou moins importante des populations au sein d'une matrice hétérogène et structurée mais aussi par leur densité et diversité très importante qui rend difficile à résoudre l'information obtenue. Toutefois, grâce aux avancées méthodologiques qui ont eu lieu depuis une quinzaine d'années, les études d'écologie microbienne bénéficient maintenant d'une automatisation des outils moléculaires (extraction d'ADN, caractérisation du polymorphisme de l'ADN, séquençage haut débit, métagénomique, métaprotéomique...) permettant la caractérisation des ressources génétiques microbiennes (diversité taxonomique, potentiel génétique et fonctionnel) des sols en moyen débit. Dans ce contexte, l'UMR Microbiologie du Sol et de l'Environnement s'est positionnée très tôt comme un leader national et international sur ces développements méthodologiques.

Dans ce contexte, l'UMR Microbiologie du Sol et de l'Environnement de l'INRA de Dijon a créé en 2008 la plateforme « GenoSol » ([http://www.dijon.inra.fr/plateforme\\_genosol](http://www.dijon.inra.fr/plateforme_genosol)), dont l'objectif est de fournir une structure logistique et technique assurant l'acquisition, la conservation, la caractérisation et la mise à disposition des ADN métagénomiques de sols issus d'échantillonnages de grande envergure (plusieurs centaines à plusieurs milliers de sols correspondant à de grandes échelles spatiales et/ou temporelles) (Ranjard et al., 2009).

Cette plateforme représente l'aboutissement de l'expertise et du savoir faire de l'unité d'adossment (UMR MSE) en termes de standardisation des outils moléculaires, mais aussi de mise en place de DNA-thèque et de base de données des ressources génétiques/biodiversité sur les sols servant aux interprétations de ces analyses à grande échelle (temps, espace). Ces analyses doivent permettre i) de combler le déficit d'approches globales et sans *a priori* qui permettront d'évaluer la contribution des facteurs environnementaux dans l'évolution des sols à long terme, ii) une meilleure connaissance, gestion et valorisation de la biodiversité et iii) une meilleure « finalisation » des résultats obtenus par la traduction de ces ressources génétiques en services écosystémiques dans le souci d'un usage durable des sols. Cette plateforme a permis à l'UMR MSE de se positionner sur différents projets scientifiques de grande envergure comme ECOMIC-RMQS, projet ANDRA, ADEME Bioindicateur et dernièrement le projet Européen ECOFINDER.

[P8]

## Anti-*Listeria* activity of calcium alginate and calcium alginate caseinate matrices entrapping *Lactococcus lactis*

**L. Léonard**<sup>a,b</sup>, A. Gharsallaoui<sup>a</sup>, I. Chouchene<sup>a</sup>, F. Ouaali<sup>a</sup>, P. Degraeve<sup>a</sup>, R. Saurel<sup>b</sup>, et N. Oulahal<sup>a</sup>

<sup>a</sup> BIODYMIA (BIOingénierie et DYnamique Microbienne aux Interfaces Alimentaires), Equipe Mixte d'Accueil n°3733 Université Lyon 1 - ISARA Lyon, Technopole Alimentec, rue Henri de Boissieu, 01000 Bourg en Bresse, France

<sup>b</sup>Equipe PAPC (Procédés Alimentaires et Physico-Chimie), UMR PAM (Procédés Alimentaires et Microbiologiques) – AgroSup Dijon/Université de Bourgogne - 1, esplanade Erasme, 21000 Dijon, France  
lucie.leonard@univ-lyon1.fr

Lactic Acid Bacteria (LAB) can be considered as the main candidate for biopreservation due to their ability to produce metabolites with strong antimicrobial effect against pathogenic bacteria. *Lactococcus lactis* is one of the LAB used for food preservation because of its ability to produce bacteriocins such as nisin, lacticin or lactococcin (1) acting in synergy with other mechanisms, such as competition for nutrients and/or pH lowering by production of organic acids. A novel and original approach for food preservation is to incorporate LAB cells into polymeric materials. This could be an alternative natural preservation method, easily applicable and of low cost. Hydrocolloids traditionally used to entrap alive microorganisms in beads (e.g. calcium alginate beads) for biotechnological applications can also be used to prepare food packaging films. Research on the possibility of using such polymeric materials as carriers for viable bacterial cells that exhibit antimicrobial activity against selected pathogens is a new challenge.

The purpose of this work was to compare two kinds of matrices (alginate and alginate-caseinate) for entrapment of viable LAB cells and release of antimicrobial products in order to inhibit *Listeria innocua* (considered because of its similarity to the pathogen *Listeria monocytogenes*, while non-pathogenic).

Preliminary assays consisted in incorporating LAB3 cells in alginate and alginate-caseinate beads and to assay directly their population and antimicrobial activity for 2 days at 30°C. Alginate-caseinate beads had both a higher number of cultivable LAB3 bacterial cells and a higher antimicrobial activity than alginate gels during the 2 days incubation at 30°C following their preparation. With the incorporation of sodium caseinate, the formation of a continuous system with an alginate gel phase and caseinate dispersed phase where the cells could locate and produce their active antimicrobials being protected could explain this observation. Concerning the potential application of such systems, we can note that the LAB3 bacterial cells initial load is a key parameter: for immediate activity, a substantial number of cells is necessary ( $10^6$  CFU/bead was enough, but not  $10^3$  CFU/bead). For an activity after 24 h, a lower initial charge was sufficient with alginate-caseinate beads.

This work is a first step to develop alginate-caseinate films with LAB cells for food packaging application with an *in situ* production of antimicrobial agents.

### References

(1) Charlier C., Cretenet M., Even S., et Le Loir Y. Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: an old story with new perspectives. International Journal of Food Microbiology, 2009, 131, 30-39.

[P9]

## Aspects physico-chimiques de l'encapsulation de *Bifidobacterium bifidum* et évaluation de sa survie dans un modèle de simulation du tractus gastro-intestinal

F. Martin, R. Cachon, P. Gervais et O. Chambin

*UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques, AgroSup-Université de Bourgogne, 1 esplanade Erasme, 21000 Dijon, France*

Les principes d'utilisation des probiotiques implique de les retrouver vivants au niveau intestinal, et notamment au niveau du côlon, après avoir été consommés par voie orale. Cela suppose qu'ils doivent passer la barrière gastrique. Malheureusement, l'environnement physicochimique de l'estomac (pH acide) puis de l'intestin grêle (sels biliaires) peut entraîner une importante, voire totale mortalité des souches probiotiques.

L'encapsulation des souches probiotiques à l'aide de biopolymères permet non seulement de protéger les probiotiques de ces conditions drastiques, mais aussi d'assurer le contrôle de leur libération dans le tractus gastro-intestinal. Les études réalisées ces dernières années dans le domaine de l'encapsulation ont porté sur de nombreux ingrédients bioactifs de natures diverses (vitamines, enzymes, principes actifs médicamenteux, ...). Toutefois, peu d'informations peuvent être transférées dans le domaine des probiotiques.

L'objectif de ce travail a été d'évaluer l'utilisation de l'encapsulation comme moyen de protection d'une souche probiotique, *Bifidobacterium bifidum*, mais aussi d'évaluer la survie de la bactérie encapsulée *in vitro* dans un modèle de tractus gastro-intestinal. Tout d'abord, nous nous sommes donc intéressés à l'influence de cryoprotectants sur la survie de *Bifidobacterium bifidum* encapsulé et lyophilisé. Après avoir déterminé quelle matrice d'encapsulation donnait le taux le plus important de survie de la souche au séchage, nous avons réalisé une étude *in vitro* dans des conditions mimant le tractus gastro-intestinal : l'estomac, l'intestin grêle et le côlon.

Cette étude nous permet ainsi d'optimiser une démarche pour la sélection des conditions d'encapsulation en fonction de la stabilité et de la libération des probiotiques dans des conditions mimant le tractus gastro-intestinal.

[P10]

## Analyse des effets anti-inflammatoires de souches probiotiques et régulation immunologique

Nabil Aoudia<sup>1</sup>, Aurélie Rieu<sup>1</sup>, Gaëtan Jego<sup>2</sup>, Romain Briandet<sup>3</sup>, Deschamps Julien<sup>3</sup>,  
Stéphanie Weidmann<sup>1</sup>, Carmen Garrido<sup>2</sup>, Jean Guzzo<sup>1</sup>

<sup>(1)</sup>UMR PAM

<sup>(2)</sup>Centre de Recherche INSERM de Dijon – Equipe 2 – Département Mort cellulaire et Cancer

<sup>(3)</sup>l'Institut MICALIS UMR INRA-AgroParisTech –équipe Bioadhésion, Biofilms et Hygiène des Matériaux

L'objectif de ce travail est de caractériser l'activité probiotique de souches du genre *Lactobacillus* et de caractériser les mécanismes d'action impliqués. Quatre souches du genre *Lactobacillus* ont été isolées à partir d'un individu volontaire

Dans un premier temps, nous avons caractérisé la capacité des 4 souches du genre *Lactobacillus* à former des biofilms en microplaques de polystyrène puis l'architecture formée par ces biofilms ont été observées en microscopie confocale (collaboration avec l'Institut MICALIS UMR INRA-AgroParisTech –équipe Bioadhésion, Biofilms et Hygiène des Matériaux).

Dans le tractus gastro-intestinal, les probiotiques sont soumis à différents stress (pH, osmolarité, présence de bile, de mucus ou de peptides antimicrobiens) qui peuvent affecter leur survie et par conséquent, peuvent modifier leurs propriétés probiotiques. Les capacités de résistances des bactéries ont été évaluées pour ces différents stress

Nous avons également étudié l'activité antagoniste des 4 souches de *Lactobacillus* contre les bactéries pathogènes par la technique de diffusion et par contact.

L'évaluation de la modulation de la réponse immunitaire dans un modèle *in vitro* de culture cellulaire a été réalisée en collaboration avec le Centre de Recherche INSERM de Dijon – Equipe 2 – Département Mort cellulaire et Cancer.

[P11]

## Le système Agr de *Listeria monocytogenes* et la croissance en biofilm : approche transcriptomique de l'effet de la température

Anne-Laure Vivant<sup>1,2</sup>, Dominique Garmyn<sup>1,2</sup>, Laurent Gal<sup>3,2,†</sup>, Pascal Piveteau<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Université de Bourgogne, UMR 1347, F-21000 Dijon, France ; <sup>2</sup>INRA, UMR 1347, F-21000 Dijon, France ; <sup>3</sup>AgroSup Dijon F-21000 Dijon, France

*Listeria monocytogenes* est une bactérie responsable de pathologies sévères chez des populations à risque (immunodéprimés, femmes enceintes, personnes âgées) en cas de consommation d'aliments contaminés. Son caractère ubiquitaire explique sa capacité à coloniser de nombreuses niches écologiques notamment grâce à son développement sous forme de biofilms. Parmi les mécanismes cellulaires qui participent à leur mise en place, l'échange de molécules de communication apparaît nécessaire chez de nombreux microorganismes. Nous avons récemment démontré que le système de communication *agr* est impliqué au cours de la croissance sessile de cette bactérie (Rieu *et al.*, 2007 ; Rieu *et al.*, 2007).

En effet, la délétion de l'un des gènes de l'opéron Agr entraîne un défaut dans les phases précoces de formation des biofilms lorsque ceux-ci sont cultivés à 25°C. De façon surprenante, la quantité de biofilm formé à 37°C est supérieure chez le mutant  $\Delta agr$  par rapport à la souche parentale.

Pour tenter d'expliquer cette inversion de phénotype en fonction de la température d'incubation, les transcriptomes du mutant  $\Delta agr$  et de la souche parentale ont été comparés aux deux températures (25°C et 37°C). Cette analyse différentielle a permis, entre autres, d'identifier la nutrition azotée comme une explication possible des différences phénotypiques observées entre les souches.

[P12]

## **Vers une optimisation de la procédure d'extraction d'ADN des sols pour caractériser la diversité microbienne tellurique par le pyroséquençage des gènes ribosomiques.**

**Pierre PLASSART<sup>(a)</sup>, Sébastien TERRAT<sup>(a)</sup>, Rob I. GRIFFITHS<sup>(b)</sup>, Bruce THOMSON<sup>(b)</sup>,  
Mélanie LELIEVRE<sup>(a)</sup>, Tiffanie REGNIER<sup>(a)</sup>, Mark BAILEY<sup>(b)</sup>, Samuel DEQUIEDT<sup>(a)</sup>,  
Christophe MOUGEL<sup>(a)</sup>, Philippe LEMANCEAU<sup>(a)</sup>, Lionel RANJARD<sup>(a)</sup>.**

<sup>(a)</sup> *INRA, UMR1347 Agroécologie, Plateforme GenoSol, BP 86510, F-21000 Dijon, France*

<sup>(b)</sup> *Centre for Ecology & Hydrology, Maclean Building, Benson Lane, Crowmarsh Gifford,  
Wallingford, Oxfordshire, UK, OX10 8BB*

*pierre.plassart@dijon.inra.fr*

Depuis plusieurs années, les communautés microbiennes du sol sont étudiées au travers de leur ADN. Le mode d'extraction de l'ADN du sol revêt donc une importance capitale pour décrire la biodiversité microbienne. A ce jour, de nombreuses procédures d'extraction d'ADN des sols sont disponibles et certaines sont mêmes standardisées (norme ISO 11063). Ces différentes techniques sont généralement basées sur une étape de lyse physique et de lyse chimique et sont surtout adaptées aux outils moléculaires de type qPCR et empreintes moléculaires. Le développement récent des techniques de séquençage massif parallèle (pyroséquençage 454), qui permettent d'aborder des inventaires taxonomiques précis et représentatifs, nous conduit à revisiter les biais associés à ces procédures d'extraction d'ADN. L'objectif de cette étude est de définir le protocole d'extraction d'ADN du sol le plus approprié pour accéder au maximum de diversité microbienne tellurique. Dans ce contexte, différentes procédures sont testées (dont la norme ISO) sur 5 sols différents de par leurs propriétés physicochimiques et leur mode d'usage. La qualité des ADN extraits selon ces différents protocoles est évaluée en termes de rendement d'extraction, d'abondance (biomasse moléculaire par qPCR) et de diversité (pyroséquençage 454 des gènes ribosomiques) des communautés bactériennes et fongiques. L'analyse des différents résultats permet de définir le protocole le mieux adapté pour accéder à la meilleure représentativité de la diversité des communautés microbiennes telluriques.

**THEME 3 :**

**Valorisation – Applications industrielles  
de résultats de recherche**

[PO7]

## De la sélection à la caractérisation d'un nouveau probiotique (projet FUI)

– Pascal Molimard –

Le projet **FUI PROBIOTIQUE** vise la sélection rationnelle et combinée de nouveaux microorganismes fonctionnels et viables dans les domaines de l'immunité et des anti-oxydants pour les filières déshydratées (poudres, comprimés) et hydratés (yaourts).

La compréhension précise des mécanismes d'action des microbes, combinaison de microbes et médiateurs sur le système immunitaire et sur la résistance aux composés oxygénés activés (ROS) permettra de développer des produits avec des effets renforcés sur le système immunitaire et/ou sur le stress oxydant.

Suivant les procédés alimentaires utilisés et l'aptitude des souches à affronter des environnements fluctuants, celles ci résistent plus ou moins à l'ensemble des étapes de préparation et de fabrication industrielle qui précèdent la consommation des produits. Les résultats issus des recherches aboutiront à la mise en place d'une méthode de criblage de nouvelles souches qui prendra en compte le caractère de résistance des souches aux variations fluctuantes des conditions industrielles de préparation des produits. Les souches ainsi retenues seront plus fonctionnelles en conditions de perturbation représentatives de leur utilisation.

L'environnement du probiotique module également considérablement la fonctionnalité d'une bactérie ainsi que ses effets sur l'organisme (capacité des souches à agir via l'environnement dans lequel elles se trouvent). Les résultats qui découleront des recherches sur les molécules exogènes et sur l'impact « souches » des conditions de stress permettront de retenir différents couples matrice/probiotique et de renforcer la fonctionnalité probiotique recherchée lors de l'intégration des souches dans la matrice. L'efficacité immuno-modulatrice et/ou anti-oxydante des nouveaux produits probiotiques « compléments alimentaires » et « yaourts naturels/fruits » sera *testée in vitro, in vivo* et chez l'homme.

[P08]

## **Evaluation des thérapeutiques anti-infectieuses : l'aventure de la création d'entreprise**

Delphine Croisier-Bertin, PharmD-PhD, fondatrice de Vivexia

Actuellement installée sur le site du centre hospitalier universitaire de Dijon dont elle est issue, la jeune entreprise Vivexia développe une plateforme d'évaluation de l'efficacité des molécules anti-infectieuses dans des systèmes expérimentaux vivants humanisés.

Après une thèse réalisée sur le développement et la prévention de la résistance du pneumocoque dans les infections pulmonaires et l'obtention du concours catégorie émergence de l'Anvar en 2005, Delphine Croisier-Bertin décide de créer sa propre entreprise en Octobre 2009. En effet, devant l'accroissement de la résistance bactérienne (70% des agents pathogènes responsables des infections des voies respiratoires sont résistants à l'un des antibiotiques de première ligne) et, dans le même temps, du désengagement des industriels dans la recherche sur le sujet, la société a choisi de développer son activité autour de la performance prédictive de ses modèles d'infection et de l'humanisation de leur traitement. L'idée, reproduire fidèlement et individuellement chez l'animal, les concentrations sanguines obtenues chez l'homme lors d'un traitement bien conduit. Aujourd'hui, peu de structures sont spécialisées dans ces modèles d'études pré-cliniques avec humanisation de la pharmacocinétique. Pour autant, ce besoin, exprimé par les agences règlementaires ; est devenu incontestable. La stratégie de l'entreprise est donc claire : formuler des recommandations pour l'utilisation d'antibiotiques afin d'en préserver la qualité.

Actuellement composée de 5 personnes, l'entreprise bénéficie du soutien actif du Professeur Pascal Chavanet, chef de service du Département Infectiologie au CHU de Dijon ainsi que des structures régionales d'accompagnement. Vivexia partage ses activités entre la réalisation de contrats industriels (dont les deux tiers aux Etats-Unis) et le co-développement de nouveaux projets de recherche avec des structures publiques ou privées locales ou nationales (recherche de nouveaux axes thérapeutiques, mise au point de nouveaux modèles, développement de l'imagerie chez le petit animal).

Pour toute information :

<http://www.vivexia.fr>

[delphine.croisier-bertin@vivexia.fr](mailto:delphine.croisier-bertin@vivexia.fr)

[P09]

## Un outil de valorisation de la microbiologie : la Plate-forme de Prédéveloppement en Biotechnologies de Welience Agro-Alimentaire et Bio-industriel"

par Joëlle De Coninck et Alain Durand

La Plateforme de Prédéveloppement en Biotechnologie (PPB) fait partie de Welience (marque d'UB-Filiale) de Dijon, plus particulièrement du pôle Agro-alimentaire et Bio-industriel. Elle accueille également une équipe de recherche appartenant à l'UMR Procédés Agro-alimentaires et Microbiologiques (PAM), ex-GPMA, d'AgroSup Dijon.

De par ses compétences en **R&D** et son outil au service du **transfert vers l'industrie** et son implication dans l'**Enseignement**, la PPB apporte un appui indispensable à l'UB, AgroSup-Dijon, à l'Institut Carnot Qualiment dans trois grands secteurs économiques majeurs en Bourgogne : l'Agro-Alimentaire, la Santé et l'Environnement.

Dans le domaine de la **fermentation en milieu liquide**, la PPB dispose comme environ une dizaine de structure équivalente en France, de bioréacteurs allant de 1 L à 500 L de capacité afin d'assurer les études d'optimisation et de scaling-up des procédés dans le domaine des IAA mais aussi dans les bioindustries en général.

Par ailleurs, la PPB offre des **compétences et des bioréacteurs pilotes uniques en France et même en Europe** au service des bioindustries dans le domaine d'une innovation de rupture représentée par la **Fermentation Milieu Solide (FMS)**. En effet, dans le contexte socioéconomique européen, compte tenu des besoins industriels en termes de production de molécules biosourcées, d'agriculture respectueuse de l'environnement, d'économie d'énergie, la fermentation en milieu solide offre une alternative très intéressante à la fermentation en milieu liquide tant sur le plan de ses spécificités que sur le plan économique. De nombreux secteurs d'activités sont concernés par ce type de procédé, en particulier le secteur agroalimentaire (enzymes, starters, additifs, nouveaux aliments fermentés.....), nutrition animale (production de protéines digestibles, probiotiques.....), le secteur agro-environnement (biofertilisants, biostimulants, biopesticides).

Les activités de la PPB sont en complémentarité totale avec les laboratoires de recherche de l'Université de Bourgogne : production de microorganismes sélectionnés pour des propriétés probiotiques ou des propriétés technologiques particulièrement adaptées à certaines industries (levains lactiques, œnologiques, production de protéines recombinantes...). Les liens sont forts en particulier avec l'Unité Procédés Agroalimentaires et Microbiologiques, d'AgroSup Dijon. De nombreux partenariats sont établis lors de programmes de recherche nationaux et internationaux (ANR, FUI, EUREKA, KBBE). De plus, la PPB, avec ses outils pilotes, apporte son soutien dans le développement de certaines start-up comme par exemple Agrene, Nexidia.

[PO10]

## Applications biotechnologiques des mycorhizes

**Dirk Redecker**, Université de Bourgogne, UMR1347 Agroécologie, ERL CNRS 6300, BP 86510, F-21000 Dijon, France

La symbiose mycorhizienne est une association entre un champignon mycorhizogène et une racine de plante-hôte. La mycorrhize à arbuscules (MA) est extrêmement ancienne puisqu'elle est datée de la même époque que l'apparition des plantes terrestres, il y a 460 millions d'années. Elle s'effectue entre un champignon mycorhizogène à arbuscules (CMA, phylum Glomeromycota) et plus de 80% des plantes terrestres. Les CMA sont des microorganismes ubiquitaires du sol et sont des biotrophes obligatoires qui nécessitent une plante-hôte pour compléter leur cycle de vie.

La plupart des plantes cultivées sont des hôtes de la MA et bénéficient de l'association. En améliorant l'exploration du sol par leur réseau de fins filaments et ainsi en augmentant l'absorption des éléments minéraux peu mobiles du sol, les champignons agissent comme biofertilisants. Ceci est en particulier de grande importance pour le phosphate, ressource limitée sur terre. De plus, les CMA sont des biorégulateurs qui modifient le métabolisme de la plante et des bioprotecteurs qui améliorent la résistance des plantes vis à vis des stress abiotiques et biotiques, tel que métaux lourds ou pathogènes microbiens.

Afin d'exploiter la MA dans des contextes agricoles il y a deux démarches principales: une augmentation de la communauté locale des CMA, ou une amélioration par inoculation. Les CMA étant des biotrophes obligatoires, la production d'inoculum fongique présente des enjeux considérables. La production dans les parcelles d'une pépinière ou en pots ouverts dans une serre est techniquement facile mais implique un contrôle rigoureux d'autres microorganismes susceptibles de se développer. La culture in vitro sur racines dans un milieu artificiel est plus exigeante et n'est possible qu'avec peu d'espèces, mais présente l'avantage d'une stérilité absolue.

Les possibles applications de la biotechnologie des mycorhizes impliquent entre autres des sols de pépinières et de champs déficitaires en microorganismes bénéfiques, des sols perturbés ou érodés et la culture de plantes produites par micropropagation. Des exemples de projets à l'INRA Dijon utilisant cette technologie seront présentés.

## Détection de *Oenococcus oeni* dans le vin par Cytométrie en flux: application au suivi de la fermentation malolactique.

Mohammad SALMA, Sandrine ROUSSEAUX, Anabelle LEGRAND, Hervé ALEXANDRE

Laboratoire VALMIs, IUVV, Institut Jules Guyot Rue Claude Ladrey, BP 27877 21078 Dijon.

Plateforme Technique de Cytométrie IFR100 Sante STIC Fac. Médecine Dijon.

[mohammad.salma@u-bourgogne.fr](mailto:mohammad.salma@u-bourgogne.fr)

L'analyse microbienne en temps réel au cours de la fermentation présente l'avantage d'apporter des mesures correctives rapidement sans préjudice pour la production. Parmi les méthodes existantes pour détecter et dénombrer les micro-organismes en milieu vin, peu d'entre elles permettent d'obtenir des résultats rapides. De plus que ce soit, les techniques de microbiologie classique ou de biologie moléculaire, elles présentent des contraintes en termes de temps, de mise en place ou de coûts (Thusitha et al 2000, Pinzani et al 2004). Quelques études ont montré que la cytométrie de flux (FCM) peut répondre aux besoins généraux et spécifiques de l'analyse microbienne du vin (Bouix et al 1999, Malacrino et al 2001, Serpaggi et al 2010).

Ainsi au cours de ce travail, la FCM a été mise au point et appliquée pour la détection et la quantification de différentes souches de *O. oeni* au cours de la fermentation de moûts de Chardonnay et de Pinot Noir en utilisant différents marqueurs : la Fluorescéine Di-Acétate (FDA) et un couple de marqueurs: le Bis-Oxonol (BOX) marqueur du potentiel membranaire et l'iodure de propidium (PI) se fixant sur l'ADN de cellules mortes.

La première étape a été d'optimiser le marquage des cellules en conditions œnologiques. L'avantage du BOX est qu'il permet de générer une forte fluorescence chez les bactéries, permettant de les distinguer facilement des débris contrairement à d'autres marqueurs comme la FDA.

Dans un second temps, l'efficacité de la FDA et du BOX/PI a été comparée en vin blanc et rouge au cours de la FML. Les résultats obtenus montrent une bonne efficacité des 2 types de marqueurs en vin blanc, avec tout de même, une intensité de fluorescence des cellules marquées avec le couple BOX/PI plus importante que celle obtenue avec la FDA.

En vin rouge, le marquage des cellules avec la FDA s'est avéré difficile et n'a pas permis un dénombrement fiable des cellules. Par contre, le marquage des cellules avec le couple (BOX/PI) a permis leur dénombrement: en effet une corrélation significative ( $r = > 0.967$ ) a été obtenue entre le dénombrement des cellules obtenu par FCM et celui obtenu par culture sur milieu gélosé et ce quelle que soit la souche utilisée.

Ainsi, l'utilisation de BOX/PI permet la quantification des populations viables et mortes de *Oenococcus oeni* en vin rouge et blanc. Ce marquage n'est pas spécifique de *O. oeni*, cependant il a tout son intérêt dans la détermination de la viabilité des levains malolactiques et du suivi de la FML où ces bactéries sont majoritaires. De futurs travaux pourraient également être développés afin de réaliser par FCM, le suivi de populations co-inoculées telles que des populations de levures et de *O. oeni* au cours de la vinification.

## Les bactéries lactiques et propioniques ont une influence majeure sur les esters produits dans des fromages à pâte pressée cuite

S. Buchin<sup>a</sup>, C.C. Licon<sup>b</sup>, G. Duboz<sup>a</sup>, J.C. Salmon<sup>a</sup>, F. Dufrène<sup>a</sup>, M.O. Coquillard<sup>a</sup>, M. C. Abeijon-Mukdsi<sup>c</sup>, R.B. Medina<sup>c</sup>, A. Thierry<sup>d</sup>

<sup>a</sup> INRA, UR342, Technologie et Analyses Laitières, 39800 Poligny, France

<sup>b</sup> Universidad de Castilla-La Mancha, Departamento de Ciencia y Tecnología Agroforestal y Genética, ETSIA-IDR, Calidad de Leche y Derivados Lácteos, 02071 Albacete, Espagne

<sup>c</sup> CERELA-CONICET, Centro de Referencia para Lactobacilos, 4000 Tucumán, Argentine

<sup>d</sup> INRA, Agrocampus Ouest, UMR1253, STLO, 35042 Rennes, France  
solange.buchin@poligny.inra.fr

Les esters confèrent aux fromages à pâte pressée cuite des arômes fruités recherchés. Différentes études antérieures ont montré des relations entre les concentrations en esters et la présence de populations bactériennes dominantes de ces fromages, bactéries lactiques thermophiles et mésophiles, bactéries propioniques. Nous avons voulu quantifier les contributions respectives de ces populations dans un même environnement fromager.

Nous avons fabriqué 24 fromages (6 pendant 4 jours) de 5 kg de type emmental, en faisant varier la composition des ferments thermophiles : ajout (T1) ou non (T0) d'une souche de *Lactobacillus delbrueckii* (LD) à un mélange de *Streptococcus thermophilus* et de *Lactobacillus helveticus*. Les jours 1 et 4, nous avons étudié l'effet des bactéries propioniques (BP) en ajoutant à chaque lait T0 ou T1, soit aucune BP (P0), soit une souche P1 ou P2 de *P. freudenreichii*. Les jours 2 et 3, nous avons étudié l'effet des lactobacilles hétérofermentaires facultatifs (LHF), en ajoutant soit aucune souche, soit une souche de *L. paracasei*, soit une souche de *L. casei*. Les fromages ont été affinés 3, 4 et 3 semaines à 12, 23 et 7°C respectivement, avec un suivi des populations bactériennes et des composés volatils.

Les ensemencements bactériens ont été conformes aux valeurs prévues, sauf pour la souche P2ensemencée 8 fois plus fortement qu'attendu. A tous les stades, les fromages ensemencés en LHF ou en BP ont montré des niveaux de ces populations plus élevés que les fromages correspondants non ensemencés. Les niveaux maximaux des ferments thermophiles étaient de  $5-9 \cdot 10^8$  ufc/g, ceux des LHF de  $8 \cdot 10^7-2 \cdot 10^8$  ufc/g et ceux des BP de  $3 \cdot 10^8-1 \cdot 10^9$  ufc/g. L'ajout de LD a entraîné une baisse des *L. helveticus* à 1 et 3 semaines. Un effet majeur (x5 à exclusif) des BP a été observé sur les esters propioniques et propyliques à 7 et 10 semaines, avec un effet souche (P2>P1>P0). Ces effets sont sans doute liés à l'effet positif des BP sur les précurseurs, acide propionique et 1-propanol. L'effet souche observé peut être dû aux niveaux supérieurs ou à une activité estérase plus forte de P2. Des effets moindres (x3 à 5) des LHF et des BP, sans effet souche, ont été observés sur l'éthyl butanoate (LHF) et l'éthyl hexanoate (LHF, BP). La concentration de ces esters n'était pas corrélée à celles de leurs précurseurs, eux-mêmes non affectés par les LHF et BP. L'effet positif des LHF sur les concentrations en 3-méthylbutyl acétate (x5 à 100) était sans doute dû à l'effet des LHF sur le 3-méthylbutanol. Un effet négatif faible de l'ajout de LD sur les acétates et le propyl propanoate (x2 à 8) a été observé, sans doute *via* des interactions.

Cette étude montre l'impact des différentes populations dominantes sur la formation des principaux esters du fromage. Des questions restent à élucider : la part dans la formation des esters du niveau de précurseurs et de l'activité estérase ; pour celle-ci, la part de la croissance bactérienne, du niveau de synthèse et d'expression de l'enzyme ; la présence d'interactions entre microorganismes dans la synthèse des esters et de leurs précurseurs ; l'impact de l'environnement fromager sur ces phénomènes.

## Inactivation de spores bactériennes sèches par hautes pressions gazeuses

A. Colas de la Noue, J.M. Perrier-Cornet, P. Gervais

*AgroSup Dijon-Université de Bourgogne*  
*UMR PAM – Equipe Procédés Microbiologiques et Biotechnologiques*  
*1, esplanade Erasme, Dijon*

Les hautes pressions hydrostatiques sont étudiées depuis plusieurs décennies dans le cadre du développement de nouvelles technologies alternatives de décontamination. Cependant, l'utilisation des hautes pressions hydrostatiques nécessite des produits à teneur élevée en eau, et cette technologie reste encore peu efficace concernant la destruction des formes résistantes comme les spores de bactérie.

L'inactivation des microorganismes à l'état « sec » représente un challenge d'autant plus important à relever puisque leur résistance se trouve généralement accrue sous forme déshydratée.

De nouveaux procédés hautes pressions sous « ciel » gazeux sont actuellement à l'étude et permettent de détruire des microorganismes sous forme sèche. Les premières études sur l'effet des pressions gazeuses sur des bactéries furent menées par Fraser en 1951 avec différents gaz dans le but de récupérer le contenu cellulaire mais elles furent menées en milieu hydraté sur des formes végétatives de bactéries (Fraser, 1951).

Il a récemment été montré que des levures sèches pouvaient être inactivées sous haute pression d'azote à 150 Mpa jusqu'à 6 log (Espinasse et al., 2008a; Espinasse et al., 2008b), et que pour des formes de résistance comme les spores bactériennes de *Bacillus subtilis*, le niveau de destruction pouvait atteindre 3 log pour des pressions de l'ordre de 500 MPa (Colas de la Noue et al., 2012).

Les étapes du procédé peuvent être décomposées en trois phases : la montée en pression du système, le maintien sous pression qui permet la sorption du gaz, et enfin la détente durant laquelle le gaz est évacué de la matrice.

L'efficacité du procédé dépend de la nature du gaz, du niveau de pression, du temps de maintien, de la cinétique de détente et du niveau d'hydratation des microorganismes. Une détente rapide et une teneur en eau très faible sont essentielles pour l'inactivation des microorganismes. L'activité de l'eau pourrait avoir une influence importante sur les propriétés plastiques et de perméabilité des différentes structures composant la spore (manteau, cortex...) ainsi que sur la fluidité de leur membrane plasmique expliquant l'importance de ce paramètre dans l'efficacité du procédé. En effet une structure plus « rigide » et moins poreuse serait plus sensible au choc provoqué par l'expansion volumique du gaz sorbé, provoqué par le retour du système à pression atmosphérique. La sorption du gaz suivie de sa désorption rapide de différents compartiments cellulaires serait donc à l'origine d'une altération mécanique de la structure, entraînant une perte d'intégrité de celle-ci suivie de la mort cellulaire.

Colas de la Noue A, Espinasse V, Perrier-Cornet JM and Gervais P. High gas pressure: An innovative method for the inactivation of dried bacterial spores. *Biotechnol Bioeng. In press*

Espinasse V, Perrier-Cornet JM, Marecat A and Gervais P. 2008a. High-pressure inactivation of dried microorganisms. *Biotechnology and Bioengineering* **99(1)**: 180-88.

Espinasse V, Perrier-Cornet JM, Marecat A and Gervais P. 2008b. High gas pressure effects on yeast. *Biotechnol. Bioeng.* **101(4)**: 729-38.

Fraser D. 1951. Bursting bacteria by release of gas pressure. *Nature* **167(4236)**: 33-34.

## Impact des conditions de déshydratation sur la survie et la fonctionnalité de souches probiotiques

G. Lemetais <sup>a,b</sup>, L. Beney <sup>a</sup>, P. Molimard <sup>b</sup>, et P. Gervais <sup>a</sup>

<sup>a</sup> UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques, Université de Bourgogne, AGROSUP Dijon, 1 Esplanade Erasme, Dijon

<sup>b</sup> Merck Medication Familiale, 18C boulevard Winston Churchill, Dijon, France France  
guillaume.lemetais@merck.fr

Les probiotiques sont des micro-organismes vivants qui affectent positivement la santé de l'hôte et interagissent avec le microbiote intestinal, les cellules épithéliales et/ou les cellules immunitaires (Ebel et al.). Depuis plus d'une décennie, ils connaissent un regain d'intérêt matérialisé par une explosion du nombre de travaux scientifiques, notamment sur le choix de techniques de stabilisation efficaces (Meng et al. 2008). En effet, les procédés de séchage industriels peuvent induire des dommages cellulaires conduisant à une perte de viabilité et de fonctionnalité (Grzeskowiak et al. 2011, Lemetais et al.). Ainsi, le contrôle des paramètres opératoires tels que la méthode de déshydratation ou la présence d'adjuvants influence fortement la survie cellulaire.

Dans cette étude, nous avons comparé l'impact de trois méthodes de déshydratation (lyophilisation, atomisation, séchage sur couche mince) sur la viabilité et la fonctionnalité de trois microorganismes probiotiques, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus zae* et *Bifidobacterium bifidum*. Outre le taux de survie, la capacité de ces bactéries à interagir avec d'autres cellules, adhérer ou coloniser un nouvel environnement a été mesurée après séchage.

Les résultats montrent des différences de viabilité entre les souches. Ainsi les bactéries *L. plantarum* et *B. bifidum* sont mieux préservées après lyophilisation alors que *L. zae* est sensible à toutes les méthodes de déshydratation testées. De plus, la fonctionnalité des cellules est fortement modifiée par le processus de fabrication et ces variations ne sont pas directement liées au taux de survie. Les propriétés immuno-modulatrices de la souche *B. bifidum* sont fortement altérées après séchage avec un ratio IL12p70/IL10 divisé par 6,8 après lyophilisation, divisé par 7,9 après séchage sur couche mince et divisé par 6,6 après atomisation. De même, la capacité d'adhésion des souches *B. bifidum* et *L. zae* est fortement diminuée après atomisation (-54% et -23% respectivement). L'utilisation d'adjuvants de séchage permet d'augmenter significativement le taux de survie des microorganismes au séchage et de maintenir leur fonctionnalité.

La compréhension des mécanismes à l'origine de la survie cellulaire à la déshydratation permet de déterminer les structures clefs à protéger. Le développement de stratégies spécifiques : Technique de séchage (lyophilisation, atomisation, séchage sur couche mince), présence d'adjuvants (sucres, acides aminés...), ou le contrôle des paramètres opératoires (cinétique, amplitude) permet aujourd'hui d'améliorer fortement la vitalité des souches. Cette étude montre l'existence de conditions optimales de déshydratation pour chaque bactérie probiotique sensible afin de préserver sa viabilité et sa fonctionnalité.

Ebel B, Lemetais G, Beney L, Cachon R, Sokol H, Langella P, Gervais P. Could probiotics prevent cardiovascular diseases? A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* DOI: 10.1080/10408398.2011.579361.

Grzeskowiak L, Isolauri E, Salminen S, Gueimonde M. 2011. Manufacturing process influences properties of probiotic bacteria. *British Journal of Nutrition* 105(6):887-894.

Lemetais G, Dupont S, Beney L, Gervais P. Air-drying kinetics affect yeast membrane organization and survival. *Applied microbiology and biotechnology*. DOI: 10.1007/s00253-012-4014-3.

Meng XC, Stanton C, Fitzgerald GF, Daly C, Ross RP. 2008. Anhydrobiotics: the challenges of drying probiotic cultures. *Food Chemistry* 106(4):1406-1416.

## Augmentation de la viabilité de *Bifidobacterium bifidum* dans un produit laitier en modifiant le potentiel d'oxydoréduction par des gaz

B. Ebel<sup>a</sup>, C. Allonneau<sup>a</sup>, F. Martin<sup>a</sup>, P. Gervais<sup>a</sup>, et R. Cachon<sup>a</sup>

<sup>a</sup>UMR PAM – Université de Bourgogne / AgroSup Dijon / Equipe PMB – Dijon  
bruno.ebel@u-bourgogne.fr

Pour mettre au point des produits laitiers probiotiques aux effets démontrés chez l'homme garantissant aux consommateurs une satisfaction totale en terme de bénéfices santé, d'innocuité et de qualité, il est indispensable de conserver voire de renforcer la viabilité des souches durant toutes les étapes de fabrication et de stockage des produits. Hors, les procédés de préparation et de fabrication perturbent significativement cette viabilité et donc l'efficacité des produits finis commercialisés. Plusieurs facteurs peuvent en être responsables, notamment la sensibilité à l'oxygène qui est citée comme étant un problème majeur de survie des probiotiques lors de la fabrication et le stockage des produits laitiers. La modification du potentiel d'oxydoréduction ( $E_h$ ) peut être une voie d'amélioration de la viabilité des bactéries probiotiques dans une matrice laitière. Cependant, la plupart des techniques utilisées sont pour la plupart soit transitoires (électro-réduction) soit négatives d'un point de vue organoleptique (cystéine). L'utilisation de gaz dans le but de modifier le potentiel redox est quant à elle très peu étudiée bien que n'entraînant aucun impact négatif sur le produit fini. En modulant le  $E_h$  avec des gaz, les conditions du tractus gastro-intestinal humain peuvent être reproduites : une condition aérobie (Contrôle, mimant les zones adjacentes à la surface du mucus), une condition réductrice (mélange Azote / Hydrogène, mimant la lumière intestinale) et une condition intermédiaire oxydante et anaérobie (Azote).

Notre étude s'est attachée à étudier l'impact de la modification du  $E_h$  par des gaz sur la survie lors du stockage dans un lait fermenté de *Bifidobacterium bifidum*. Ainsi trois laits fermentés avec des  $E_h$  initiaux ajustés à +440 mV (lait contrôle), +350 mV (lait dégazé avec  $N_2$ ) ou -300 mV (lait dégazé avec  $N_2-H_2$ ) ont été utilisés. Les profils d'acidification, la croissance pendant la fermentation ainsi que la survie pendant le stockage à 4 °C pendant 28 jours ont été analysées. La composition en acide gras ainsi que la fluidité membranaire de *B. bifidum* ont également été déterminées respectivement par chromatographie gazeuse et par l'anisotropie de fluorescence. La résistance intrinsèque au stress oxydant a enfin été mesurée.

Cette étude montre que les laits fermentés à partir de lait dégazé sous  $N_2$  et plus particulièrement sous  $N_2-H_2$  permettent une meilleure survie de *B. bifidum* au cours du stockage sans affecter les cinétiques de fermentation et la survie de *St. thermophilus* et *Lb. bulgaricus*. Cette meilleure survie est également observée en condition réductrice après un stress oxydant. De plus, contrairement à la composition en acide gras, la fluidité membranaire reste constante quelque soit les conditions de  $E_h$  employées. Ces résultats peuvent expliquer la meilleure survie observée dans les laits fermentés sous  $N_2$  et  $N_2-H_2$ . L'utilisation des gaz permet donc d'améliorer la survie de souches probiotiques sensibles durant le stockage et ceci sans affecter les propriétés d'acidification des ferments du yaourt.

## Impact de la modulation de la réponse inflammatoire pulmonaire et systémique de l'hôte médiée par TLR2 dans un modèle animal de pneumopathie acquise sous ventilation mécanique à *Staphylococcus aureus*.

L.A. Pauchard<sup>2</sup>, P.E. Charles<sup>1,2</sup>, R. Bruyere<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Service de Réanimation Médicale, Hôpital Le Bocage, C.H.U. de Dijon, France.

<sup>2</sup>UMR 1347 Agroécologie AgroSup/INRA/uB - Pôle MERS, 17 rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon Cedex, France

**Objectifs :** Les pneumopathies acquises sous ventilation mécanique (PAVM) font parties des infections nosocomiales les plus fréquentes en réanimation. Parmi les bactéries responsables, les souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline (SARM) sont responsables d'infections très sévères. La réponse inflammatoire est induite suite à la reconnaissance de ces microorganismes par les Toll-Like Receptors 2 (TLR2), spécifiques des bactéries à gram positif. Nous avons montré dans notre modèle de PAVM à SARM que le stress mécanique lié à la VM augmentait l'expression de TLR2 par les cellules épithéliales pulmonaires. Une stimulation de ces récepteurs par les bactéries conduit à l'exacerbation de la réponse inflammatoire aboutissant alors à l'aggravation de lésions pulmonaires préexistantes et à la diminution des défenses antibactériennes du poumon. Nous avons tout d'abord souhaité confirmer les précédents résultats obtenus pour le modèle animal de PAVM à SARM en allongeant la période de suivi à 24 heures au lieu de 8 heures.

**Matériels et Méthodes :** Deux groupes de lapins New-Zealand ont reçu un inoculum calibré de  $10 \log_{10}$  UFC de SARM par instillation dans les voies aériennes pour induire la pneumonie. Un groupe (n=6) a été intubé et ventilé sous anesthésie générale pendant 24 heures et l'autre groupe (n=6) a été laissé en respiration spontanée. Le Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- $\alpha$ ) et l'Interleukine 8 (IL-8) ont été détectés par enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) dans les sérums et broyats de poumons et de rates des animaux de chaque groupe. L'expression des gènes de l'IL-8 et du TNF- $\alpha$  a été mesurée après rétro-transcription des ARNm en ADNc suivie d'une qPCR (quantitative polymerase chain reaction). La clairance bactérienne pulmonaire et systémique a été évaluée à partir de cultures bactériennes quantitatives réalisées sur des échantillons de poumons et de rates. L'atteinte pulmonaire a été évaluée par examen microscopique à partir d'échantillons de tissus pulmonaires colorés à l'hématoxyline-éosine puis un score semi-quantitatif a été attribué en fonction de la sévérité de l'atteinte.

**Résultats :** La plus forte expression génique de TLR2 a été observée dans le groupe des animaux infectés et soumis à ventilation mécanique (VM+SARM), traduisant l'effet synergique des deux agressions sur l'expression pulmonaire du gène *tlr2*. Les niveaux de transcrits les plus élevés pour les gènes *il8* et *tnf* ont été mesurés dans le groupe VM+SARM. Les concentrations sériques les plus importantes en cytokines inflammatoires correspondantes IL-8 et TNF- $\alpha$  ont également été observées chez les animaux ayant développé une pneumopathie sous ventilation mécanique. Des lésions majorées du tissu pulmonaire ont été observées dans le groupe VM+SARM traduisant l'action synergique de la VM et de l'infection par SARM. Les cultures bactériennes ont montré des concentrations bactériennes pulmonaires plus élevées dans le groupe VM+SARM traduisant une diminution de la clairance bactérienne dans les poumons de ces animaux. Aucune différence n'a en revanche été observée dans les concentrations bactériennes spléniques entre les deux groupes d'animaux.

**Conclusion :** Nous avons montré dans ce modèle de PAVM à SARM avec un suivi de 24 heures de la pneumonie que la combinaison *Staphylococcus aureus*-VM induisait la surexpression pulmonaire de TLR2. Dans ce contexte, l'inflammation locale, en réponse à l'infection bactérienne était exacerbée et conduisait à de sévères lésions tissulaires du poumon et à la diminution de la clairance bactérienne. Il s'y associait une augmentation significative de l'inflammation systémique.

**Perspectives :** Il serait intéressant d'atténuer la réponse inflammatoire pulmonaire et systémique médiée par TLR2 pour avoir un effet protecteur dans le contexte d'une pneumopathie expérimentale à *Staphylococcus aureus* chez un animal sous VM. L'administration concomitante d'une antibiothérapie active sur la bactérie permettrait en outre de prévenir le risque de croissance bactérienne non contrôlée. Nous nous proposons d'antagoniser directement TLR2 par des anticorps monoclonaux bloquants et d'atténuer la réponse inflammatoire dépendant de TLR2 par une statine.

## Diagnostic de la maladie du Poumon de Fermier : Utilisation d'antigènes recombinants issus de micro-organismes de l'environnement.

C. Barrera<sup>a</sup>, B. Rognon<sup>a,b</sup>, G. Reboux<sup>a,b</sup>, S. Roussel<sup>a,b</sup> and L. Millon<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Université de Franche-Comté, UFR SMP, UMR CNRS 6249 Chronoenvironnement – Besançon

<sup>b</sup>Centre Hospitalier Universitaire de Besançon, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie -  
Besançon  
coralie.barrera@univ-fcomte.fr

La maladie du Poumon de Fermier (PDF) est une pneumopathie d'hypersensibilité (PHS). Les PHS sont des maladies respiratoires liées à l'inhalation de micro-organismes contaminant divers substrats agricoles, industriels ou domestiques (dans le cas du PDF ce sont les fourrages). Le diagnostic de ces maladies est difficile car les symptômes sont caractérisés de pseudo-grippaux. Les techniques d'immunoprécipitation recherchant les immunoglobulines G (IgG) et utilisant des antigènes totaux de micro-organismes environnementaux ont prouvé leur efficacité mais manquent de standardisation. Actuellement, les antigènes totaux sont fabriqués de façon artisanale dans chaque laboratoire et leur composition varie d'un lot à l'autre même lorsque les conditions de culture sont harmonisées. Les laboratoires utilisent donc des antigènes très différents et même au sein d'un laboratoire donné, les résultats des techniques d'immuno-précipitation peuvent varier en fonction des lots de fabrication des antigènes. L'objectif est le développement d'un kit de diagnostic standardisé utilisant des antigènes recombinants spécifiques des contaminants microbiologiques.

Trois micro-organismes impliqués dans le PDF ont été choisis pour le développement d'antigènes recombinants (une moisissure, une mucorale, et un actinomycète). Les protéines immuno-réactives sont repérées à l'aide de sérums de malades par western blot à deux dimensions puis identifiées par spectrométrie de masse. Le gène codant pour la protéine d'intérêt est amplifié par PCR puis inséré dans un vecteur bactérien et cloné dans *Escherichia coli*. La protéine est produite par induction à l'IPTG puis purifiée. Les protéines recombinantes sont testées par un ELISA indirect avec des sérums de patients et des sérums d'agriculteurs sains. L'efficacité du test est évaluée par une analyse en courbe ROC (Receiver Operating Characteristics).

Deux antigènes recombinants issus d'*Aspergillus fumigatus* une espèce proche d'*Eurotium amstelodami* impliqué dans le PDF et cinq directement issus de *Saccharopolyspora rectivirgula* ont été produits, testés et validés par les tests statistiques.

Les deux antigènes recombinants d'*A. fumigatus* ont obtenus une sensibilité de 72% et des spécificités de 94% et 84%. Ces deux antigènes combinés permettent d'augmenter l'efficacité du test avec une sensibilité de 89% et une spécificité de 84%. Les cinq antigènes de *S. rectivirgula* ont une sensibilité comprise entre 75 et 85% et une spécificité de 63 à 85%. Ces antigènes combinés deux à deux ne permettent pas l'amélioration des sensibilités et spécificités. Néanmoins, l'utilisation simultanée des cinq antigènes avec l'établissement d'une règle permettant de classer un sérum comme positif lorsque trois antigènes sur cinq sont positifs, permet d'obtenir une sensibilité de 80% et une spécificité de 81.5%. Par ailleurs la combinaison des scores obtenus pour deux antigènes recombinants de *A. fumigatus* et deux de *S. rectivirgula* permet encore d'augmenter la sensibilité à 93% et la spécificité à 100%.

Les agriculteurs ne sont pas sensibilisés de la même manière aux différents micro-organismes retrouvés dans leur exploitation agricole ; ainsi l'utilisation d'un panel d'antigènes totaux dans les tests diagnostic avait déjà été démontré et se confirme par cette nouvelle étude avec l'utilisation d'antigènes recombinants. D'autres antigènes recombinants issus d'une mucorale *Lichtheimia corymbifera* sont en cours de production et viendront compléter le panel. Une étude prospective incluant des patients de différents pays (Finlande, Canada) exposés à d'autres souches de micro-organismes devra être réalisée pour valider ce nouveau test à une plus large échelle. Le test ELISA est un test peu onéreux, rapide et reproductible donc propice à la commercialisation mais avant cette étape finale d'autres paramètres devront être préalablement testés et validés telle que la stabilité des antigènes une fois fixés sur la plaque ELISA.

## Un exemple de valorisation industrielle (Unité PAM/Welience) : développement d'un vaccin vétérinaire

P. Gervais<sup>a</sup> et J. De Coninck<sup>b</sup>

<sup>a</sup>*UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques (PAM), AgroSup Dijon / Université de Bourgogne, Dijon*

<sup>b</sup>*WELIENCE Agro-alimentaire et Bio-industriel, Plate-forme de Prédéveloppement en Biotechnologies (PPB), Dijon  
deconinc@dijon.inra.fr*

Un programme FUI (NEOTOK, 2009-2012) a été mis en place avec pour objectif de développer un nouveau vaccin vétérinaire dirigé contre la toxoplasmose en optimisant sa production industrielle et sa conservation. Un consortium s'est constitué entre des partenaires aux compétences complémentaires : l'Unité Procédés Alimentaires et Microbiologiques (PAM), spécialiste du séchage des microorganismes, Welience Plate-forme de Prédéveloppement en Biotechnologies (PPB), chargée du développement à l'échelle industrielle des procédés microbiens et la société VITAMFERO, jeune entreprise innovante dédiée à la mise au point de vaccins dirigés contre des maladies infectieuses. Ces nouveaux vaccins sont développés sur la base de modifications génétiques particulières des Apicomplexes par invalidation de gènes (technologie « KO »).

Les Apicomplexes sont des parasites intracellulaires responsables de maladies animales (toxoplasmose, néosporose, coccidiose...) et humaines (toxoplasmose, paludisme..) aux conséquences dramatiques en santé publique et sur le plan économique. En santé humaine, il n'existe aucun vaccin contre ces maladies. Dans le domaine vétérinaire, les vaccins disponibles utilisent des souches atténuées peu stables et dont l'efficacité est réduite en raison de leur faible durée de conservation.

Parallèlement au développement des conditions de production de la souche *Toxoplasma gondii*, les conditions de conservation du vaccin candidat anti-toxoplasmose ont été étudiées, l'objectif étant de conserver les parasites viables et infectieux pendant une durée d'au moins 6 mois. Plusieurs procédés de conservation ont été sélectionnés, notamment la déshydratation, la congélation et la lyophilisation.

## Dernières données sur les mécanismes physiologiques impliqués dans l'adaptation de la bactérie lactique *Oenococcus oeni* au milieu vin

Raphaëlle Tourdot-Maréchal, Michèle Guilloux-Benatier, Cosette Grandvalet, Jean Guzzo, Stéphanie Wiedmann, Aurélie Rieu, Vanessa David, Hervé Alexandre

*Equipe VALMiS – UMRA 02.102 PAM  
Institut Universitaire de la Vigne et du Vin – Université de Bourgogne  
Campus Montmuzard BP 27877 – 21078 Dijon Cedex – France*

Notre équipe, par une approche pluridisciplinaire, focalise ses recherches sur les mécanismes d'adaptation de la bactérie *Oenococcus oeni* à son environnement. Nos travaux appréhendent plus particulièrement le métabolisme azoté et les mécanismes impliqués dans la régulation de la fluidité membranaire chez cette bactérie lactique d'intérêt œnologique.

### Métabolisme azoté de *O. oeni*

Les faibles concentrations et la grande diversité des sources azotées du vin supposent une adaptation particulière de la bactérie à son environnement. Malgré les nombreuses auxotrophies identifiées chez *O. oeni*, les besoins azotés s'avèrent faibles et peuvent être assurés uniquement par des peptides. Les peptides sont transportés par des systèmes qui consomment de l'énergie. Une fois internalisés, ces peptides sont essentiellement métabolisés par la peptidase à proline, PepI. Contrairement aux autres bactéries, l'activité aminopeptidase générale demeure minoritaire chez *O. oeni*, PepI étant l'activité enzymatique principale de la voie d'hydrolyse des peptides contenant de la proline. Nous avons également montré que la régulation du métabolisme azoté de la bactérie est indépendante du répresseur transcriptionnel CodY présent chez les autres bactéries lactiques. Outre les peptides, les protéines sont également une source d'azote potentielle pour la bactérie. En effet, par une approche protéomique nous avons identifié une protéase, EprA qui diffère des autres protéases connues. *O. oeni* possède donc un métabolisme azoté adapté à son environnement.

### Mécanismes impliqués dans le maintien de l'intégrité membranaire

Une perturbation de l'intégrité de la membrane induit, chez *O. oeni*, la synthèse de la small Hsp Lo18. Cette protéine est capable de s'organiser *in vitro* en tétramère de trimères et des structures équivalentes ont été mises en évidence *in vivo*. Lo18 possède une activité de chaperonne ATP-indépendante ainsi qu'une activité lipochaperon, participant au maintien de l'intégrité de la membrane. Il a été démontré une induction de l'expression du gène *hsp18* codant cette protéine suite à une fluidification de la membrane. Cette réponse de la cellule implique le répresseur transcriptionnel CtsR. Identifié à ce jour comme l'unique et le principal régulateur de la réponse au stress chez cette bactérie lactique, CtsR interagit avec la région promotrice des gènes *hsp* réprimant ainsi leur expression en conditions optimales de croissance.

Afin d'appréhender au niveau moléculaire le mode d'interaction entre Lo18 et la membrane, des protéines recombinantes comportant une mutation ponctuelle dans le domaine  $\alpha$ -cristallin ont été construites et caractérisées *in vivo* chez *E. coli*.

Lorsque *O. oeni* est cultivée en conditions de stress, une modification de la composition en acides gras membranaires est marquée par la cyclopropanation de l'acide oléique en acide cyclique dihydrosterculique. L'annotation du génome de la souche ATCC BAA-1163 a révélé l'existence d'un gène codant une protéine similaire à la Cfa synthase impliquée dans la cyclopropanation des acides gras insaturés. En conditions de stress, le taux de transcrits de ce gène augmente suggérant une régulation transcriptionnelle de son expression selon un mécanisme non caractérisé à ce jour. L'étude de la fonctionnalité du gène *cfa* de *O. oeni* a également été menée en système d'expression hétérologue. Pour cela, un mutant *cfa* déficient de *L. lactis cremoris* a été construit et complété par une copie du gène *cfa* de *O. oeni* permettant ainsi d'apprécier la fonctionnalité de ce gène. Les mesures de viabilités et de fluidités membranaires réalisées au cours de ces travaux remettent en cause le rôle prédominant des acides gras cycliques dans l'acido-tolérance chez les bactéries lactiques

[P16]

## **Biodiversity of non-*Saccharomyces* yeasts from Burgundy vineyards**

**Mohand SADOUDI**, Sandrine ROUSSEAU, Cédric LONGIN, Hervé ALEXANDRE,  
Raphaëlle TOURDOT-MARECHAL.

*UMR A 02-102 PAM Université de Bourgogne – AgroSup Dijon Equipe VAIMiS  
Institut Jules Guyot IUVV, Rue Claude Ladrey BP 27877 21 078 Dijon Cedex  
mohand.sadoudi@u-bourgogne.fr*

### **ABSTRACT**

Few studies have described the biodiversity of indigenous yeasts on grape, in function of the location of plots and cultural practices. In this study, the indigenous yeasts were isolated from grape juice collected in Burgundy wineries, vintage 2010. The different yeast species were identified by PCR ITS-RFLP and confirmed by the sequencing of specific regions. *Hanseniaspora uvarum* was the major species isolated, while other species belonging to genera *Candida*, *Metschnikowia*, *Pichia* and *Kluyveromyces* were isolated in less proportion. The repartition of isolated yeasts populations was studied according to various parameters including the origin of the plot, the vine variety and cultural practices of the vineyard. Isolates from organic plots showed a large diversity of yeasts characterized by *H. uvarum*, *Candida* sp., *C. oleophila*, *P. membranifaciens*, *M. pulcherrima* and *M. viticola*, while only *C. zemplinina*, *H. uvarum* and *M. pulcherrima* were isolated from non-organic plots. This work has highlighted the isolation of some non-*Saccharomyces* strains poorly documented: *C. oleophila* and *M. viticola*.

**Keywords: grape berries, indigenous yeast diversity, cultural practices**