



HAL
open science

Adaptation de *Propionibacterium freudenreichii* aux stress coliques : approches protéomique et transcriptomique

Taous Saraoui

► **To cite this version:**

Taous Saraoui. Adaptation de *Propionibacterium freudenreichii* aux stress coliques : approches protéomique et transcriptomique. 2011, 34 p. hal-01454168

HAL Id: hal-01454168

<https://hal.science/hal-01454168>

Submitted on 6 Jun 2020

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

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



UNIVERSITE DE RENNES 1

(U.F.R Sciences de la vie et de l'Environnement)



AGROCAMPUS OUEST

Institut Supérieur Des Sciences Agronomiques,
Agroalimentaires, Horticoles et du Paysage.

MASTER SCIENCES, TECHNOLOGIES, SANTE

Mention : Recherche en Biologie

Spécialité : Microbiologie Fondamentale et Appliquée

**Adaptation de *Propionibacterium freudenreichii* aux
stress coliques : approches protéomique et
transcriptomique**

Mémoire présenté le 10/06/11

Par Taous SARAoui

Encadrant : Gwénaél JAN

Hélène FALENTIN

Stage effectué au laboratoire de Microbiologie UMR 1253

**UMR STLO (Science et Technologie du Lait et de
l'Œuf**

INRA- AGROCAMPUS OUEST

65, rue de Saint Briec – 35042 Rennes



Présentation technique du stage

Master 2 Microbiologie Fondamentale et Appliqué

Année universitaire 2010-2011

**Adaptation de *Propionibacterium freudenreichii* aux
stress coliques : approches protéomique et
transcriptomique**

Auteur : Taous SARAOUI

Maîtres de stage : Gwénaél JAN ; Hélène FALENTIN

Laboratoire : UMR1253 STLO (Science et Technologie du Lait et de l'Œuf)

65, rue de Saint Briec

35042 RENNES Cedex

Tél : +33 (02) 23 48 53 22 ou 70 32

Fax : +33 (02) 23 48 53 50

Durée : 03/1/2011-30/06/2011

Remise du rapport : 10/06/11

Soutenance orale : 22/06/2011

Remerciements

Je remercie tout d'abord Sylvie LORTAL, directrice de l'UMR-AGROCUMPUS ouest STLO, de m'avoir accueilli au sein du laboratoire. Je remercie aussi Yves LE LOIRE de m'avoir intégré à son équipe B2ISI et de sa bonne humeur.

Je tiens à remercier Monsieur Gwenaël JAN pour m'avoir prise sous sa responsabilité, pour m'avoir appris énormément de choses en partageant ces connaissances techniques et rédactionnelles, mais aussi pour avoir toujours été disponible et m'avoir consacré du temps malgré son emploi du temps chargé. Je le remercie surtout pour avoir été aussi patient avec moi.

Je tiens à remercier madame aussi madame Hélène FALENTIN pour tout ce que j'ai appris, d'avoir partagé ces connaissances mais aussi pour avoir toujours été disponible et m'avoir consacré du temps malgré son emploi du temps chargé. Je la remercie surtout d'avoir toujours eu confiance en moi.

Merci au personnel du SNAH de INRA de St-Gilles : Gaëlle BOUDERY, Alain CHAUVIN, Francis LEGOUVEC et Vincent PIEDVACHE. Et le personnel de La plateforme SCRIBE : Jérôme MONFORT, Aurélie LECAM et Gregory GUERNEC. Je vous remercie de votre accueil et de votre sympathie.

Je remercie Fabien COUSIN, doctorant au STLO, d'avoir toujours été disponible. Il m'a apporté énormément durant son stage. Je remercie aussi Vincent PETON et Caroline Le MARECHAL de m'avoir toujours aidés et soutenus.

Merci Paulette AMET et Jessica MUSSET pour leur bonne humeur et leur amitié. Leur présence au laboratoire m'a toujours rendu le sourire.

Enfin, je remercie tous les gens du STLO pour leur accueil chaleureux et pour leurs sympathies.

Sommaire

Liste des abréviations

I. Introduction.....	1
I-1. Mécanismes d'adaptation aux stress digestif.....	2
A. Acquisition et transport de sucres	2
B. Biosynthèse et transport de composées non glucidiques.....	3
C. Enveloppe cellulaire.....	4
D. Chaperonne et protéines de réponse au stress.....	5
E. Systèmes à deux composantes.....	5
I-2. Les mécanismes de survie découverts par l'utilisation des IVET.....	6
a. Acquisition et transport de sucres	6
b. Biosynthèse et transport de composées non glucidiques.....	6
c. Enveloppe cellulaire.....	7
d. Chaperonne et protéines de réponse au stress.....	7
II. objectif du stage.....	7
III. Matériels et Méthodes.....	7
III-1. Bactéries propionique et condition de cultures.....	7
III-2. Dispositif de dialyse.....	8
III-3. Expérimentation sue l'animal.....	8
a. Animaux utilisés.....	8
b. Séjour de <i>P. freudenreichii</i> CIRM-BAI dans le côlon.....	9
III-4. Analyse protéomiques.....	9
a. Extraction des protéines totales.....	9
b. Electrophorèse monodimensionnelle.....	10
c. Electrophorèse bidimensionnelle ; focalisation isoélectrique (IEF) et SDS-PAGE.....	10
d. Coloration des protéines.....	11

III-5. Analyse transcriptomique.....	11
a. Extraction d'ARN.....	11
b. Analyse de la qualité des ARN extraits.....	11
IV. Résultats et Discussion.....	13
IV-1. La température de 39°C est létale pour <i>P. freudenreichii</i> CIRM-BAI 1.....	13
IV-2. Le dispositif de dialyse permet la diffusion de molécules de PM < 50 kDa.....	13
IV-3. Les sels biliaires dialysent à travers le dispositif de dialyse.....	15
IV-4 <i>P. freudenreichii</i> CIRM-BAI 1 s'adapte à l'environnement colique.....	17
IV-5 L'expression des protéines de <i>P. freudenreichii</i> varie avec les conditions de culture..	19
IV-6. <i>P. freudenreichii</i> conserve une activité métabolique dans l'environnement colique...	19
A. Quantification des ARN totaux.....	19
B. Validation des ARN totaux.....	21
Conclusion et perspective.....	24
Référence bibliographie.....	25

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

B : *Bifidobacterium*

CIRM-BIA

DO : densité optique.

Da : dalton

FDA : Food and Drug Administration

FOA : Food and Agriculture Organization.

h : heures

IVET : *In vivo* expression technologie

kDa : kilodalton

min : minutes

ml : millilitres

ng : nano-grammes

nm : nanomètres

L : litres

Lb : *Lactobacillus*

P : *Propionibacterium*

PCR : polymerase chain reaction

PM : poids moléculaire

UFC : Unité Formant Colonie

YEL : Yeast extract-lactate-broth

YELA : Yeast extract-lactate-broth Agar

µl : microlitres

µg : microgrammes

°C : degré Celsius

Liste des Tableaux et Figures

Tableau 1: La majorité des ARN extraite de culture de *P. freudenreichii* CIRM-BIA-1 ont une quantité et qualité suffisante pour une analyse transcriptomique par puce à ADN..... 22

Figure 1 : *P. freudenreichii* CIRM-BIA-1 croit et survit à une température de 30°C et non à 39°C, température interne du porcelet.....12

Figure 2 : Sachet de dialyse permettant l'introduction et le retrait de *P. freudenreichii* CIRM-BIA-1 en culture pure dans le côlon.....14

Figure 3: Le milieu colique permet la survit de *P. freudenreichii* CIRM-BIA-1 malgré la température de 39°C.....16

Figure 4: L'expression des protéines de *P. freudenreichii* CIRM-BIA-1 est modulée en fonction de l'environnement et la de la température.18

Figure 5: Les ARN extrait de l'environnement colique ne sont pas dégradé20

I. Introduction

Les bactéries propioniques laitières sont des bactéries de la classe des Actinomycètes à haut pourcentage en GC. Elles sont pléïomorphes, Gram positives, non mobiles et non sporulantes. Elles sont mésophiles, poussant à une température optimale de 30°C et elles se développent en anaérobiose mais sont aérotolérantes. Ces bactéries sont hétérofermentaires capables de métaboliser des sucres (glucose, galactose, lactose, fructose), mais aussi des acides (lactique, pyruvique) et des alcools tels que le glycérol et l'erythritol (33).

Ces bactéries et plus précisément l'espèce *Propionibacterium freudenreichii*, sont couramment utilisées comme ferment dans l'industrie laitière et consommées en grande quantité. *Propionibacterium freudenreichii* est notamment responsable de la flaveur et de l'ouverture des Emmentals, liées à la production de propionate, d'acétate et de CO₂ par fermentation du lactate. Grâce à ces caractéristiques métaboliques et au fait qu'elle est utilisée dans la production du fromage, cette bactérie est reconnue comme GRAS (Generally Recognised As Safe) aux Etat-Unis par la FDA (13) et QPS (Qualified Presumption of Safety) en Europe (8).

Propionibacterium freudenreichii appartient au groupe des bactéries propioniques laitière actuellement considérées comme ayant des potentiels probiotiques (15). Les probiotiques sont décrits par la FAO (Food and Agriculture Organization) comme étant des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquat exercent un effet bénéfique sur la santé de l'hôte (9). Durant ces dernières années, différentes études ont montré que les probiotiques avaient des propriétés bénéfiques sur la santé de hôte. Les modes d'action par lesquels les probiotiques sont considérés comme contribuant à la santé humaine sont classés en quatre catégories. Le premier mode est le fait que certains probiotiques peuvent exclure ou inhiber des agents pathogènes. Le second mécanisme est le fait d'améliorer la fonction de la barrière épithéliale intestinale en modulant diverses voies de signalisation qui conduisent, par exemple, à l'induction de la production de mucus et de défensines, à l'amélioration du fonctionnement des jonctions serrées et à la prévention de l'apoptose. Le troisième est la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte (20). Enfin les probiotiques peuvent moduler le microbiote intestinal et apporter des enzymes bénéfiques (la β -galactosidase) (30).

Obligatoirement, pour qu'une bactérie soit exploitée comme probiotique, elle doit être tolérante aux différents stress technologiques (faible pH, différentes températures, encapsulation et autres) mais aussi avoir la capacité de survivre durant le passage du système digestif (34) où elles rencontrent de nombreux systèmes de défense. Ceci inclut des concentrations élevées du mucus qui

recouvre l'intestin, de l'acide chloridrique induisant un faible pH dans l'estomac et des sels biliaires sécrétés dans le contenu intestinal à proximité de l'intestin grêle (9).

I-1. Mécanismes d'adaptation aux stress digestif

Durant ces dernières décennies, différentes études, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*, ont été réalisées afin de mieux comprendre les mécanismes que les bactéries probiotiques telles que les *Lactobacillus*, les *Bifidobacterium* et les *Propionibacterium*, utilisent pour mieux se défendre contre les différents stimuli qu'elles rencontrent durant leur passage à travers le système digestif des Hommes et des Animaux. Ces mécanismes sont dus à l'expression de plusieurs gènes et protéines intervenant dans diverses fonctions.

A. Acquisition et transport des sucres

Quand une bactérie probiotique est soumise à un stress tel que le stress acide ou le stress biliaire ou durant son passage à travers le système digestif, les cellules modifient leur métabolisme énergétique et les voies de transport des glucides. Une étude faite par Marco et collaborateurs en 2010 montre que durant le transit du système digestif humain ou de souris, *Lb. plantarum* 299v induit les gènes codants pour deux α -mannosidase, trois glycosyltransférase (localisées au niveau de la surface cellulaire) et codants le transport du glycérol et glycérol-3-phosphate mais aussi les gènes codants pour le transport et les enzymes intervenant dans l'utilisation du maltose, de la cellobiose, du lactose, du galactose et du mélibiose (27). Alors que durant le stress biliaire les gènes codant pour le transport du cellobiose, saccharose, arabinose chez *Lb. plantarum* WCFS1, sont réprimés (4).

La mutation des gènes codants le PTS (Phosphotransferase System) du mannose (LJ1654 à LJ1656) diminue la résistance aux stress biliaire chez *Lb. rhamnosus* GG (17) et chez *Lb. johnsonii* NCC533 durant le passage à travers le système digestif des souris, alors que la mutation des gènes codant la biosynthèse des exopolysaccharides augmente la tolérance aux stress digestif (10).

Les transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) sont réprimés chez *Lb. plantarum* WCFS1 lors du stress biliaire (4). Alors qu'une étude faite chez *Lb. reuteri* ATCC 23272, montre qu'ils sont induits lorsque la bactérie est confrontée à un stress acide (21).

Les *Bifidobacterium* sont des bactéries qui ne possèdent qu'une seule voie d'utilisation du glucose, la voie du fructose-6-phosphatephosphokétolase (F6PPK) ou shunt des bifidobactéries. Chez *B. longum* NCC2705, trois enzymes sur les neuf intervenant dans cette voie sont surexprimées dans l'intestin du lapin : une transaldolase, une transcétolase et une ribose-5-phosphate isomérase (38). Alors que des études par spectrométrie MS/MS des protéines détectées par électrophorèse 2D chez *B. longum* NCIMB (31) et chez *B. animalis* subsp. *lactis* (32) en

présence de 1.2g/l de sel biliaire montrent qu'il y a induction de Xfp, enzyme responsable de la conversion du fructose-6-phosphate en D-acétyl-phosphate ou en glycéraldéhyde-3-phosphate et de Gap, enzyme impliquée dans la conversion du glycéraldéhyde-3-phosphate en glycéraldéhyde-1,3-bisphosphate. L'induction de l'enzyme Gap a été aussi remarquée chez *Lb. reuteri* ATCC 23272 durant un stress acide (21).

L'induction des enzymes P_{gk} (phosphoglycérate kinase), G_{pm} (phosphoglycérate mutase) et P_{yk} (pyruvate kinase) impliquées dans la conversion de glycéraldéhyde-3-phosphate en pyruvate a été observée durant un stress biliaire chez *B. longum* NCIMB (31) et chez *Lb. rhamnosus* GG, ainsi que chez *Lb. reuteri* ATCC 23272 durant un stress acide (21).

La lactate déshydrogénase (Ldh2) et l'acétate kinase (AsckA) impliquées dans la biosynthèse du lactate et de l'acétate respectivement ; la GlpP (glycogen phosphorylase) qui hydrolyse le (1-4 α -D glucosyl)_n en présence de phosphate inorganique. L'enzyme UDP- glucose-4-épimérase (GalE1), impliquée dans l'utilisation des sources de carbone autre que le glucose durant la croissance, est induite par un stress biliaire chez *B. longum* NCIMB (31). L'induction de la phosphoglycérate mutase impliquée dans la fermentation des glucides non digestibles et l'induction de LacZ chez *B. longum* NCC2705 dans l'intestin du lapin a été montrée (38).

Chez *P. freudenreichii* S141 les stress biliaire et acide induisent une BCCP (Biotine carboxyl Carrier Protein) qui est une sous-unité d'une transcarboxylase multimérique responsable de la décarboxylation du méthylmalonyl-coenzyme A et de la carboxylation du pyruvate (15, 23). La méthylmalonyl-coenzyme A, enzyme spécifique de la fermentation propionique et du cycle Wood et Weckman. La transcription de cette même transcarboxylase chez *Propionibacterium ssp* lors de son passage à travers le système digestif de l'Homme a permis de prouver que la bactérie y était encore active métaboliquement (13).

B. Biosynthèse et transport de composés non glucidiques

Durant les stress causés par le passage à travers le système digestif, les bactéries probiotiques modifient l'expression des gènes codant des protéines intervenant dans la biosynthèse et le transport des acides aminés et des nucléotides. Par exemple, l'induction de la protéine CTP synthétase est responsable de la synthèse de cytosines à partir de pyrimidines et de la cystéine synthétase chez *Lb. reuteri* lors d'un stress acide (22). Cette enzyme a été aussi identifiée, codée par le gène *cysK* comme induite *P. freudenreichii* durant un stress biliaire. Cette protéine est impliquée dans la synthèse de la cystéine à partir de *O*-acétyl-serine et de sulfure d'hydrogène (23). Durant un stress biliaire, il y a aussi induction de l'arginosuccinate synthétase (3) et de la glutamate décarboxylase et de deux autres gènes impliqués dans le métabolisme du glutamate chez *Lb.*

plantarum WCFS1 (4). Une glutamine synthétase est induite par *B. longum* NCC2705 dans le colon du lapin (38).

C. Enveloppe cellulaire

Les différentes macromolécules constituant l'enveloppe cellulaire des bactéries probiotiques ont été décrites comme contribuant à l'intégrité de la cellule durant différents stress (19). Par exemple, une étude par microarrays chez *Lb. reuteri* 55730 lors d'un stress acide (pH 2), montre l'induction d'un gène codant pour une estérase de la famille des β -lactamases, des protéines qui inhibent la pénicilline. Ces protéines sont couramment impliquées dans la synthèse du peptidoglycane. En revanche, la mutation de cette estérase n'affecte pas significativement la croissance (phase exponentielle légèrement plus lente). Cette étude montre aussi l'induction d'une phosphatidylglycérophosphatase impliquée dans la synthèse des phosphatidylglycérols et cardiolipines, qui sont les composés majeurs de la membrane bactérienne. Et aussi l'induction d'une protéine de liaison à la pénicilline, impliquée dans la synthèse des peptidoglycanes. Chez les bactéries Gram positives, l'opéron *dlt* code des protéines importantes pour l'esterification des résidus D-alanine dans les acides teichoïques associés à la paroi cellulaire. La D-alanylation des acides teichoïques est importante pour la tolérance au stress acide (34). En plus, la mutation du gène *dltD* provoque une sensibilité de *Lb. rhamnosus* GG lors stress biliaire (17) et son induction a été remarquée chez *Lb. reuteri* 100-23 (37) et chez *Lb. casei* (Oozzer *et al.*, 2004) lors de leur passage à travers le système digestif.

Les protéines BbmA/ BbmB et BbmR (multidrug resistance transporteurs) sont surexprimées lors d'un stress biliaire chez *B. longum* NCC2705 (12).

Le stress acide induit l'expression du gène *ffh* codant pour une enzyme responsable de l'exportation des protéines chez *B. longum* BBMN68 (16). Cette enzyme active la F_0F_1 ATPase qui n'est pourtant pas induites (16).

Une étude par RTq-PCR montre que la F_0F_1 ATPase est induite chez *Lb. plantarum* Lp9 et *Lb. plantarum* Lp91 durant le stress acide (11). En 2006, Bron *et al.* ont montré également l'induction de cette enzyme chez *Lb. plantarum* WFCS1 durant le stress biliaire (4). La F_0F_1 ATPase génère de l'ATP, crucial pour répondre aux effets du stress.

Il a été aussi montré que les gènes codant pour les protéines extracellulaires et pour la biosynthèse des polysaccharides étaient surexprimées alors que les gènes codant pour la synthèse du peptidoglycane, des acides lipoteichoïques et de la membrane cellulaire sont non affectés chez *Lb. plantarum* 299v dans le système digestif de l'Homme et des souris (27). La répression des gènes

codants pour la synthèse d'exopolysaccharides (EPS) durant le stress biliaire chez *Lb. rhamnosus* GG a été décrite (17, 37).

D. Chaperonne et protéines de réponse au stress

Les protéines impliquées dans la réparation de l'ADN et la protection des protéines sont induites chez les bactéries lors d'un stress ou lors de leur passage à travers le système digestif. Des études de spectrométrie de masse faites par Jan et collaborateurs pour l'identification des protéines de réponse au stress chez *P. freudenreichii* S141, montrent l'induction des protéines GroEL et GroES impliquées dans la réparation des protéines dénaturées par un stress. GroEL, GroES et DnaK ont été identifiées comme étant induites aussi lors d'un stress acide chez *Lb. acidophilus* (26), chez *Lb. delbruecki* subsp bulgaricus (25), chez *Lb. reuteri* ATCC 23272 (22) et chez *B. adolescentis* (31) et chez *P. freudenreichii* S141 lors d'un stress biliaire (23). Alors que ces gènes sont réprimés lors d'un stress acide chez *B. longum* BMW68 (16).

La production de protéines de la famille des Clp est induite. Le gène codant la protéine ClpL, une ATPase avec une activité de chaperonne dégradant les protéines endommagées est induit chez *Lb. reuteri* durant un stress acide (34). Des protéines Clp sont aussi induites chez *B. longum* durant son passage à travers le système digestif et chez *P. freudenreichii* S141 par les stress biliaire et acide (15, 23).

Cappa et collaborateurs observent l'augmentation du niveau d'expression du gène *uvrA* codant pour la sous unité A de l'exonucléase ABC impliquée dans la réparation de l'ADN à un faible pH, suggérant l'importance de ce système lors d'un stress acide chez *Lb. helveticus* CNBL 1156 (7, 22).

E. Systèmes à deux composantes

Des études faite par Wall et al (34) montrent que *Lb. reuteri* ATCC 55730 induit un système à deux composantes homologue à l'opéron *yycFG* de *Bacillus subtilis*, et de *Lb. sakei*. Chez *Bacillus subtilis*, ce système est impliqué dans le métabolisme de la paroi cellulaire. Chez *B. longum*, un système à deux composantes composé d'un régulateur transcriptionnel et d'une Serine/thionine kinase avec un segment transmembranaire est induit lors d'un stress biliaire chez *B. longum*, *B. adolescentis* (31). Ce système serait composé d'une histidine kinase et d'une protéine de fonction inconnue. Cette dernière serait similaire à ImpA de *Salmonella typhimurium*. ImpA est impliqué dans la protection contre les dommages que peu causés les UV sur l'ADN.

Un niveau élevé d'expression du gène *luxS* codant pour un auto-inducteur 2 a été mis en évidence chez *Lactobacillus sp* lors d'un stress acide (28) et chez *B. longum* NCC2705 dans le

système digestif du lapin. Suggérant que ce dernier profite pleinement des avantages de ces enzymes pour réduire le niveau de compétitivité pour l'acquisition des nutriments dans le système digestif (38).

I-2. Les mécanismes de survie découverts par l'utilisation des IVET

Comme il est important de comprendre les mécanismes de survie de bactéries probiotiques et commensales durant leur transit du système digestif, les chercheurs utilisent tous les moyens pouvant les conduire à cet objectif. Pour cela, comme montré dans le chapitre précédant, diverses études ont été réalisées. Ces études portent sur des modèles *in vitro* de stress acide et biliaire qui sont les stress majeur du tube digestif, mais aussi sur des travaux *in vivo* réalisées sur divers animaux ou sur des fèces humains.

Les IVET sont des techniques d'analyses utilisant divers marqueur auxotrophique, les gènes reporteurs doubles, et de gènes de résistance aux antibiotiques afin de détecter les promoteurs activés spécifiquement durant l'infection par les pathogène (1). Quelques chercheurs travaillant sur des thématiques liées à la compréhension des mécanismes de survie de bactéries probiotiques et commensales durant leur transit du système digestif ont adapté cette technique (IVET) afin de voir les gènes induits *in vivo* (ivi genes).

Cette technique confirme les que les gènes induits *in vivo* jouent un rôle dans des fonctions citées précédemment :

a. Acquisition et transport des sucres

Bron et al en 2004 ont montré que *Lb. plantarum* WCFS 1 induit 5 gènes de transport de glucides appartenant à la famille des PTS : PTS de N-acétyl-glucosamine, de sorbitol, de saccharose de cellobiose et de ribose. Il est intéressant de remarquer l'induction d'un PTS de cellobiose alors que le gène codant ce PTS n'est pas présent sur les opérons PTS précédemment décrits. Ce PTS est homologue à « orphan » cellobiose-PTS-IIC de *L. monocytogenes* jouant un rôle dans la signalisation spécifique de l'interaction pathogène/hôte.

Ils ont montré aussi l'induction de ribose perméase et d'une ribose kinase ainsi que deux enzymes (α -L-rhamnosidase et 6-phospho- β -glucosidase) impliquées dans l'hydrolyse de di- et polysaccharides.

Il a été montré que *Lb. reuteri* 100-23 induisait une xylose isomérase (XylA) dans le côlon de souris. Elle est impliquée dans l'acquisition de nutriment. Elle est régulée en absence de glucose et en présence de xylose. Le xylose étant un sucre dérivant des plantes, ceci laisse supposer que *Lb. reuteri* trouve un facteur de croissance végétal dans le côlon des souris. Remarquablement, l'utilisation du xylose n'a pas été décrite précédemment chez *Lb. reuteri* (35, 36).

b. Biosynthèse et transport des composés non glucidiques.

Il a été montré que des gènes codant des MDR impliquée dans l'efflux sont induits par *Lb. plantarum* WCFS 1 dans le système digestif. Ces protéines font partie de la stratégie de *H. pylori* pour coloniser le système digestif des souris. Des gènes de transport de métaux ont été aussi induits par cette bactérie (2).

c. Enveloppe cellulaire

Les études faites par IVET montrent l'induction des voies de synthèse des EPS impliqués dans l'interaction avec les cellules épithéliales intestinales de l'hôte. Cette induction a été observée chez *Lb. reuteri* 100-230 (35) et chez *Lb. plantarum* WCFS 1 (2).

d. Chaperonne et protéines de réponse au stress

Les gènes intervenants dans la réponse au stress tel que : *clpC* sont induites chez *Lb. plantarum* WCFS 1 dans le système digestif des souris. Chez *Streptococcus*, des mutants de *clpC* sont sensibles à un faible pH. De plus la mutation du gène *ctsR* codant pour le régulateur du gène *clpC* chez *L. monocytogenes* réduit la survie durant l'infection chez les souris. Cela suggère que l'induction de *clpC* chez *Lb. plantarum* WCFS 1 se passe dans l'estomac (2).

En plus de ce gène de réponse au stress, le gène *msrB* codant une méthionine sulfoxide réductase est induit. Cette enzyme intervient dans la dégradation des protéines endommagé par l'oxydation de la méthionine en méthionine sulfide.

II. Objectifs du stage

Ce stage s'inscrit dans un projet de recherche financé par le CRITT Santé Bretagne (projet ProDiCo) qui vise à étudier le dialogue entre la bactérie probiotique *Propionibacterium freudenreichii* d'une part et les cellules de l'intestin, plus précisément du côlon, d'autre part. La partie « effet de la bactérie » ne sera pas étudiée dans ce stage. Plus précisément, l'objectif du présent stage est d'identifier les mécanismes d'adaptation de la bactérie *P. freudenreichii* à l'environnement colique afin de comprendre ses capacités de survie lors de son séjour dans le tractus gastro-intestinal.

L'approche envisagée est l'étude globale du protéome et du transcriptome de la bactérie, en comparant 3 conditions différentes : bactéries dans un milieu de laboratoire à 30°C (température de croissance de la bactérie) et à 39°C (température du cochon) ainsi que les bactéries qui ont séjourné 24 heures dans le colon du porcelet.

III. Matériels et Méthodes

III-1. Bactéries propioniques et conditions de culture

La souche bactérienne utilisée dans cette étude est *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA 1. Sa croissance a été effectuée à 30°C, 37°C et 39°C en milieu Yeast extract-lactate-broth (YEL) (Malik, 1968). Les dénombrements ont été faits sur milieu gélosé YELA, après incubation à 30°C en anaérobiose (Anaerocult, Merck, France), pendant 5 jours.

III-2. Dispositif de dialyse

Un dispositif a été réalisé en utilisant une membrane de dialyse (INTERCHIM, 6 *Spectra/Por*[®] *Dialysis Membrane MWCO : 50.000 Da*). Un tube de membrane, fermé à son extrémité par un nœud, a été assujéti sur un cathéter et l'étanchéité a été assurée par des sutures à l'aide d'un fil de chirurgie (Figure 2A). La stérilisation de ce dispositif a été réalisée à une température de 105°C pendant 10 min dans un autoclave (pbi international).

Pour obtenir des concentrations cellulaires de 10^{10} UFC/ml, des cultures de *P. freudenreichii* CIRM-BIA 1 à 30°C en phase stationnaire (72h) à 5.10^9 UFC/ml ont été réalisées puis concentrées 5x dans du YEL : centrifugation de 100 ml de cultures (4000g/10min/température ambiante), et resuspension des culots obtenus dans 20 ml de milieu YEL. 5 ml des cultures concentrées ont été injectés dans chaque dispositif de dialyse à travers les cathéters à l'aide de seringues munies d'aiguilles.

III-3. Expérimentation sur l'animal

a. Animaux utilisés

Les expériences de ce stage ne peuvent être réalisées chez l'Homme pour des raisons d'éthique évidentes. L'utilisation d'un modèle animal pertinent a été nécessaire. Nous avons choisi des porcelets. En effet, le porcelet, animal omnivore, présente une physiologie intestinale très proche de celle de l'Homme, que ce soit en termes de colonisation du tube digestif (bien que la flore dominante chez les porcelets soit *Lactobacillus sp*, chez l'Homme il s'agit de *Bifidobacterium sp*) (29), de développement post-natal des fonctions intestinales (6), de physiologie ou d'immunité mucoale (5).

Quatre porcelets (Largewhite*Landrace*Pietrain) de 10 semaines d'âge et de 30 kg environ, en provenance de l'élevage expérimental de l'UMR SENAH, INRA de Saint-Gilles, ont été acclimatés pendant 1 semaine dans des cages individuelles. Ils ont ensuite subi une opération chirurgicale afin de placer une canule en silicone dans le côlon. Après une mise à jeun de 12h les porcelets ont été sédatisés (kétamine 10mg/ml) puis transférés en salle de chirurgie. Ils sont alors anesthésiés (isoflurane). Une laparotomie a été pratiquée, le côlon proximal localisé. Une canule en silicone a été introduite dans le côlon proximal (15 cm en aval de la valvule ileo-carecale). La canule a été ensuite extériorisée sur le flanc droit de l'animal (Figure 3A). Les soins postopératoires

ont consisté en un traitement analgésique (chlorhydrate de morphine s.c) avant laparotomie et 12h après l'opération et une antibiothérapie (ampicilline 30mg/kg/24h) pendant 3 jours. La plaie de stomie a été nettoyée quotidiennement. Les animaux ont été réalimentés progressivement et libres de leur mouvement

b. Séjour des *P. freudenreichii* CIRM-BIA 1 dans le côlon.

Sept jours après la pose de la canule, les animaux ont été sédatés (Kétamines 10mg/kg). Ensuite le dispositif de dialyse contenant 5 ml de culture à 10^{10} UFC/ml a été introduit dans le côlon via la canule colique. Ce dispositif a été attaché à la canule à l'aide d'un fil de suture pour éviter la migration du dispositif à cause du peristaltisme. La canule a ensuite été rebouchée. Les animaux ont été ensuite libres de leurs mouvements et alimentés normalement. Après 24 heures les animaux ont été à nouveau sédatés et le dispositif de dialyse récupéré via la canule (Figure 3B). Un nouveau dispositif contenant 5 ml (10^{10} ufc/ml) de *P. freudenreichii* CIRM-BIA 1 a été réintroduit pour une durée de 24h. En tout, 4 sachets de dialyse ont été introduits dans le colon des porcelets, en 4 jours consécutifs. La température rectale des porcelets était mesurée chaque jour au moment de l'introduction de dispositif.

Après lavage abondant des dispositifs par de l'eau distillée (élimination du contenu colique resté collé aux dispositifs), les bactéries ont ensuite été aspirées à l'aide de seringues munies d'aiguilles à travers les cathéters. Puis l'intérieur du dispositif de dialyse a été lavé 2x avec 3 ml de tampon isotonique (*PBS-Tris pH8.5*). Les cultures ainsi récupérées ont été soumises à des analyses bactériologiques, protéomiques et transcriptomiques.

- 90 µl des bactéries ont été utilisés pour faire des numérations sur milieu YELA.
- $1/10^{\text{ème}}$ des bactéries a été utilisé pour l'analyse transcriptomique
- $9/10^{\text{ème}}$ restant ont été utilisés pour l'analyses protéomique

En parallèle, des témoins en été réalisés. 24 cultures de *P. freudenreichii* (10 ml) ont été réalisées. Après 72h de culture à 30°C (phase stationnaire) 12 culture ont été laissées à 30°C pendant 24h et 12 culture ont été transférées à 39°C pendant 24h.

III-4. Analyses protéiques

a. Extraction des protéines totales

Des cultures de *P. freudenreichii* sont centrifugées (4000g, 5min, 4°C). Les cellules sont alors lavés deux fois avec du Tampon (*PBS-Tris pH8.5*) puis du Tampon (*PBS pH7.4*). Les culots récupérés sont repris dans 1ml de tampon de lyse (*Tris HCl 50 mM pH7.5, SDS 0.3% DTT 20 mM*). Ces suspensions sont alors soumises à trois cycle de congélation/décongélation (-20°C/30°C) avec ajout de 1% de PMSF à la première décongélation, puis traitées aux ultra-sons 4 min à température

ambiante (Sonicateur Bioblock Scientific VibraCell). Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation (12000g, 10 min, 20°C). Les échantillons de protéines sont conservés à – 20°C jusqu'au jour de l'analyse.

b. Electrophorèse monodimensionnelle

Cette électrophorèse est réalisée selon le protocole de LAEMMLI (18). La composition des gels est définie selon la nomenclature de HJERTEN (14) où T représente la concentration totale en monomère (Acrylamide/bisacrylamide) exprimée en g/100ml et C le pourcentage de bisacrylamide par rapport à la quantité totale de monomères. Les gels ont été réalisés sur Mini-PROTEAN 3 (BIO-RAD) pour les petits gels 1D ainsi que sur un PROTEAN II xi Cell (BIO-RAD) pour les grands gels 1D (kit 16 cm x 16 cm).

- Gel inférieur de séparation : T = 12%, C = 3.3% tampon Tris-HCl 375 mM pH 8,8 ; SDS 0.1% ; APS 0.05% ; TEMED 0.15%
- Gel supérieur de concentration : T = 4%, C = 3.3% tampon Tris-HCl 125 mM pH 6,8 ; SDS 0.1% ; APS 0.05% ; TEMED 0.15%
- Catholyte et anolyte : Tris 25 mM, glycine 152 mM, SDS 0.1%.
- Tampon d'échantillon : Tris-HCl 1,25 M pH 6,8 ; SDS 4% ; DTT=0.6% ; 20% de glycérol ; bleu de bromophénol 0.02%.

Les protéines mélangées avec le tampon d'échantillon sont dénaturées en chauffant 10 min à 100°C avant le dépôt sur le gel.

La migration a été effectuée jusqu'à la sortie du front de migration selon une tension de 60 à 75V pour les minis gels 1D et 100V à 180 V pour les grands gels 1D.

c. Electrophorèse bidimensionnelle ; focalisation isoélectrique (IEF) et SDS-PAGE

Pour ne pas perturber la focalisation isoélectrique, toute trace de sel, de lipides, d'acides phénoliques et nucléiques doit être éliminée. Pour cela un volume d'échantillon préalablement défini à partir des résultats des électrophorèses 1D a été précipité à l'aide du 2D Clean-Up Kit (selon le protocole du fournisseur). Puis repris dans une solution de réhydratation (DeStreak™ Rehydration solution, GE Healthcare) contenant de l'urée, tensioactif neutre, ampholyte et réducteurs des ponts disulfures.

Les IEF ont été réalisées sur bandelettes de gel de 18 cm, de gradient de pH 4-7, linéaires, sur un système électrophorétique Multiphor II (Pharmacia Biotech) et Immobiline DryStrip (GE Healthcare). Les échantillons protéiques, repris dans la solution de réhydratation, sont déposés à l'extrémité acide des bandelettes, préalablement réhydratées dans la même solution de

réhydratation. La migration a été effectuée au minimum pendant 22,5 heures, selon un programme en 8 étapes permettant une accumulation de 60kVh (15).

En fin de focalisation, les bandelettes ont été soumises à une équilibration en les plongeant successivement pendant 10 min dans les solutions d'équilibration I [TrisHCl, pH7.5 (50mM) ; Urée (6M) ; glycérol (30%) ; SDS (1%) ; DTT (3mg/ml)] et d'équilibration II [TrisHCl, pH 7.5 (50mM) ; Urée (6M) ; glycérol (30%) ; SDS (1%) ; Iodoacétamide (4.5%); bleu de bromophénol (trace)]. Le DTT permet de réduire les ponts disulfures, alors que l'iodoacétamide alkyle les fonctions SH. Ces étapes permettent de complexer les protéines avec le SDS et d'éliminer certains constituants des gels de première dimension.

Les protéines, complexées avec le SDS, présentent toutes une charge globale négative. Soumises à un champ électrique, elles migrent alors en fonction de leur poids moléculaire, à l'intérieur d'un tamis moléculaire constitué d'acrylamide. La seconde migration se fait sur des gels verticaux de polyacrylamide à 12% (18 × 18 cm) avec un voltage de 70V pendant 1,5 heures puis 100V pendant 24 heures, dans un tampon de migration de Laemmli. Cette étape est réalisée sur un EttanDALTwelve (Amersham Bioscience).

d. Coloration des protéines

Les protéines, après migration dans les gels, ont été fixées dans une solution de fixation (10% acide acétique ; 30% éthanol technique). Elles ont été ensuite révélées par coloration avec une solution colloïdale de bleu de coomassie (Bio-safe Coomassie, BIO-RAD). L'excès de colorant est éliminé par lavage successifs des gels dans de l'eau distillée. Les gels ont ensuite été scannés (Image Scan III, GE Healthcare)

III-5. Analyse transcriptomique

a. Extraction d'ARN

Pour chaque culture bactérienne, afin de préserver les ARN, deux volumes de RNA protect (Qiagen) ont été ajoutés à un volume de culture. Les bactéries ont ensuite été culotées 10 minutes à 8000g, puis leurs parois ont été fragilisées avec du lysozyme (20 mg/ml dans du Tris EDTA). Les bactéries ont été cassées 2x 90 min dans un broyeur MM301 à l'aide d'une solution contenant des billes et du SDS à 10%. Les ARN totaux ont été ensuite purifiés avec le RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) selon les recommandations du fournisseur. Les ARN totaux ainsi récupérés ont été traités par une DNase (DNA-free, Ambion) afin d'éliminer toute éventuelle contamination avec de l'ADN génomique. Les extraits ont ensuite été dosés au Nanodrop et conservés à -80°C.

b. Analyse de qualité des ARN extraits:

La qualité des ARN totaux a été validée par analyse électrophorétique sur une puce Bioanalyseur (Bioanalyseur Agilent 2100), selon le protocole fourni par le fournisseur.

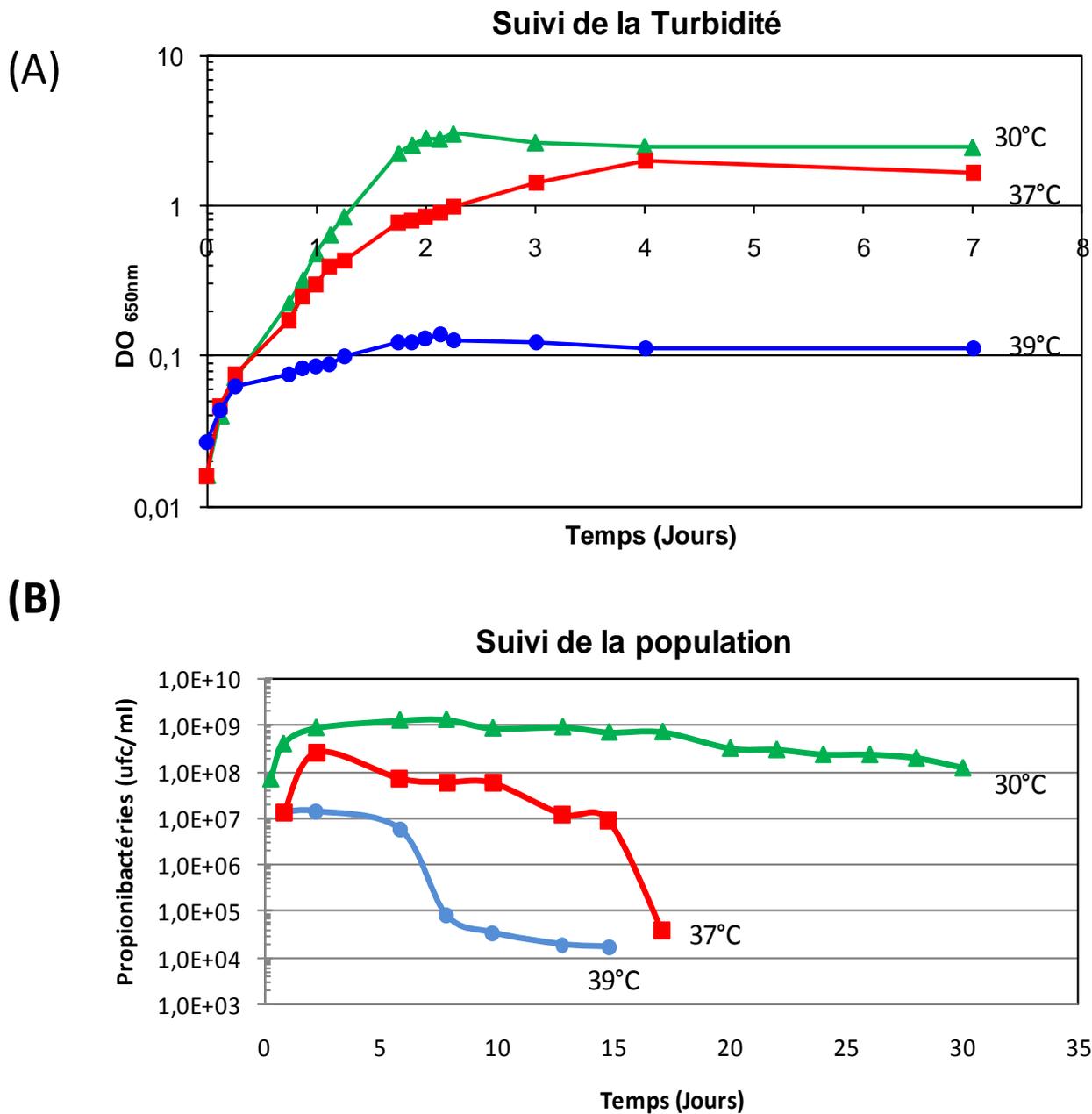


Figure 1 : *P. freudenreichii* CIRM-BIA-1 croit et survit à une température de 30°C et non à 39°C, température interne du porcelet.

Des cultures de *P. freudenreichii* ont été réalisées sur milieu YEL et à différentes températures: 30°C (▲), 37°C (■) et 39°C (●).

(A) : Suivi de croissance de *P. freudenreichii* CIRM-BIA-1 par mesure de DO à une $\lambda = 650\text{nm}$ au cours du temps.

(B) : Suivi de survie de *P. freudenreichii* CIRM-BIA-1 par numération sur boîte contenant du YELA à des temps de croissance différents.

IV. Résultat et Discussion

IV-1. La température de 39°C est létale pour *P. freudenreichii* CIRM-BIA 1

Dans un premier temps l'étude de la capacité de *P. freudenreichii* CIRM-BIA 1 à croître et à survivre à trois températures différentes a été réalisée. Les températures de croissance étaient 30°C (température optimale de croissance de la bactérie), 37°C (température interne de l'Homme) et 39°C (température interne des porcelets)

Le suivi de la croissance (Figure 1A) et de la population (Figure 1B) à 30°C confirme les résultats obtenus précédemment dans le laboratoire. Montrant que *P. freudenreichii* croît jusqu'à atteindre une DO_{650nm} entre 2.5 et 3 et une population d'environ 5.10^9 UFC/ml, avec un temps de génération de 5h. La population se stabilise ensuite formant ainsi une longue phase stationnaire.

Le suivi de croissance des cultures à 37°C est proche de celui des cultures à 30°C. Une différence est observée au niveau du temps de génération qui est de 7h à 37°C au lieu de 5h à 30°C. Le suivi de la population à 37°C montre que la population bactérienne augmente durant les deux premiers jours de croissance (phase exponentielle) mais au lieu de se maintenir durant la phase stationnaire comme à 30°C, on remarque une perte de viabilité progressive au fil des jours. Ceci laisse supposer que la stabilité dans la mesure de DO après deux jours de culture (phase stationnaire) est due à la présence de bactéries mortes et de débris cellulaires.

Au contraire, il a été remarqué que la croissance était faible à 39°C. Les bactéries se développent légèrement jusqu'à atteindre une $DO_{650nm} \approx 0.130$ puis cessent de croître. Alors que le suivi de la population montre une légère augmentation de la population durant les premières heures de croissance puis une perte de viabilité radicale.

Ce résultat montre que *P. freudenreichii* CIRM-BIA 1 ne s'adapte pas à une température de 39°C qui est la température interne des porcelets. Bien au contraire, cette température lui est létale. Pour cela lors de ce stage le temps de séjour de *P. freudenreichii* dans les côlons des porcelets a été limité à 24h.

IV-2. Le dispositif de dialyse permet la diffusion de molécules de PM < 50kDa

Ce dispositif a été conçu afin de faire séjourner une culture pure de *P. freudenreichii* dans le côlon d'un porcelet. Il doit permettre ainsi la diffusion de molécules de poids moléculaire inférieur à 50 kDa (nutriments, sel biliaire, d'acide et autres composés stressant) tout en empêchant la diffusion de molécules de PM supérieur à 50 kDa et de bactéries. Il s'agit d'appliquer à *P. freudenreichii* les conditions stressante du milieu colique. Afin de valider ce dispositif, différents contrôles ont été réalisés :

- La diffusion de petites molécules à travers les pores de la membrane de dialyse a été suivie à l'aide d'une solution de bleu de bromophénol (PM= 669,99 Da) à 1%. 5 ml de

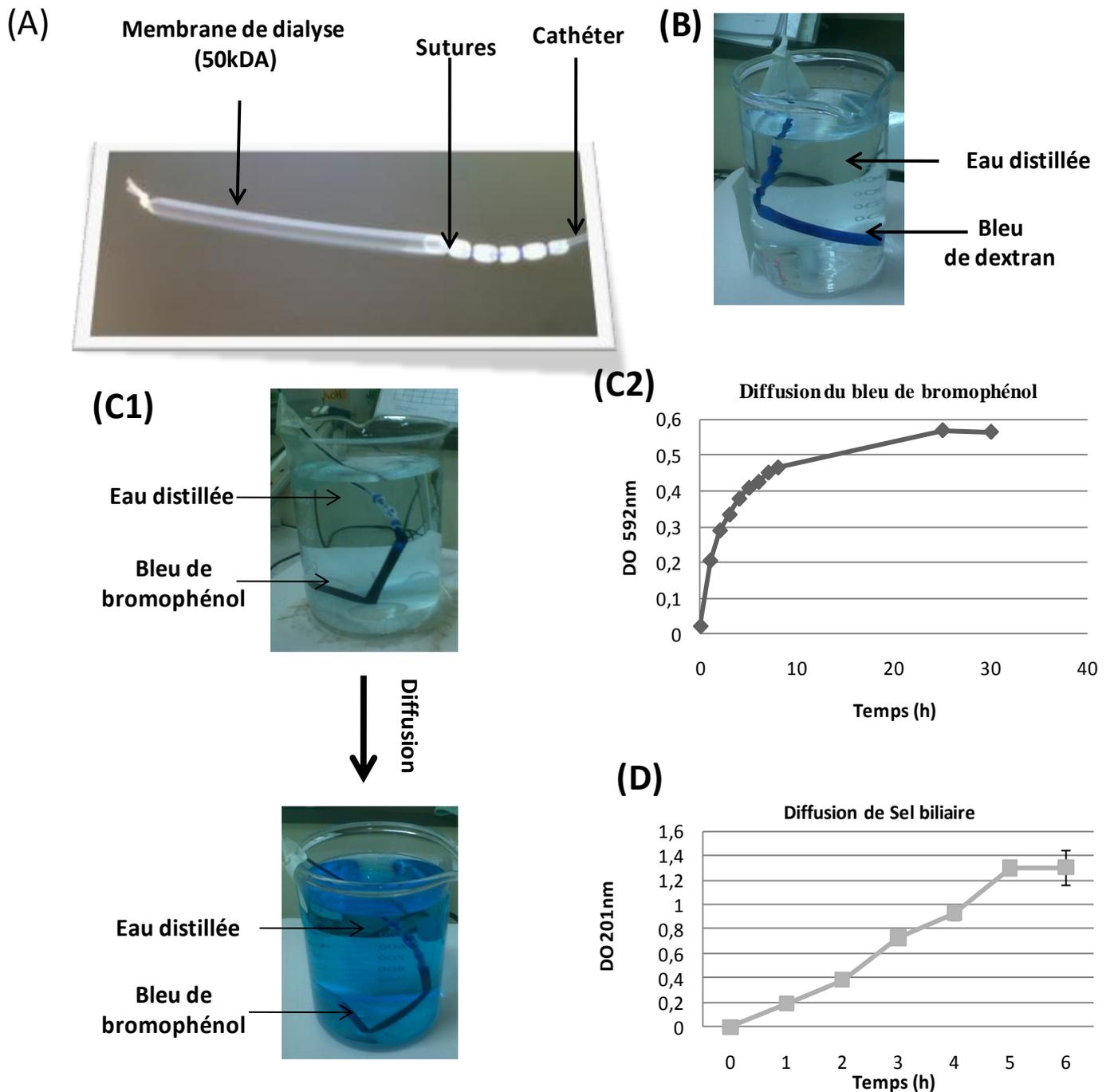


Figure 2 : Sachet de dialyse permettant l'introduction et le retrait de *P. freudenreichii* CIRM-BIA-1 en culture pure dans le colon.

(A) : Sachet de dialyse: un tube de membrane de dialyse (cut off = seuil de coupure : 50 kDa) a été assujéti à un cathéter. L'étanchéité est assurée par une série de sutures. Ce dispositif permet la diffusion de petites molécules et empêche la diffusion de grosses molécules

(B) : Photo montrant l'étanchéité du sachet de dialyse. Le bleu de dextran (PM = 10 000kDa) ne diffuse pas à travers la membrane de dialyse. Une solution à 1% de bleu de dextran a été dialysée 24 h contre 1L d'eau distillée

(C) : Une solution de bleu de bromophérol (PM= 669 Da) à 1% a été introduite dans le sachet et dialysée contre 1L d'eau distillée. La diffusion du bleu de bromophérol a été mise en évidence par la coloration de l'eau distillée (Figure 2-C1). Elle est suivi au cours du temps par mesure de DO_{592nm} de l'eau distillée (Figure 2-C2)) au cours du temps

(D) : Un sachet de dialyse contenant de l'eau distillée a été introduit dans un bēcher contenant 1L d'une solution de sel biliaire à 1g/l. La diffusion des sels biliaires à travers la membrane de dialyse a été suivi en mesurant la DO_{201nm} .

bleu de bromophénol jusqu'à ce que l'équilibre entre les deux milieux soit atteint. Ces résultats montrent que le bleu de bromophénol a bien diffusé à travers la membrane et que le dispositif conçu permet la diffusion de molécules de PM < 50 kDa.

- La validation de l'étanchéité du sachet a été réalisée à l'aide d'une solution de bleu de dextran (PM=10 000 kDa) à 1%. 5 ml de cette solution ont été injectés dans le dispositif de dialyse puis dialysés contre 1L d'eau distillée. La non-diffusion du bleu de dextran a été mise en évidence par absence de coloration de l'eau distillée (Figure 2B). Ce résultat montre que le dispositif est bien étanche et que les molécules ayant un PM > 50 kDa ne diffusent pas à travers la membrane de dialyse.

Cette validation du dispositif conçu assure que le fait d'introduire une culture pure de *P. freudenreichii* dans le dispositif permet de ne pas perdre la culture bactérienne et de conserver sa pureté, pendant son séjour dans le côlon des porcelets. Pour confirmer cette supposition, 5 ml de culture bactérienne ($2,11 \times 10^9$ UFC/ml) ont été introduits dans un dispositif puis dialysés contre 1L d'eau triptonée. La non-diffusion des bactéries a été mise en évidence par numération sur YEL des bactéries à l'intérieur et à l'extérieur du dispositif après 24h de dialyse. Les résultats de la numération à 24h sont $1,13 \times 10^9$ UFC/ml à l'intérieur du dispositif alors qu'à l'extérieur du dispositif, aucune colonie n'a été observée sur les boîtes contenant les dilutions au $1/10^{\text{ème}}$.

IV-3. Les sels biliaires dialysent à travers le dispositif de dialyse

Les sels biliaires sont le stress majeur que les bactéries peuvent rencontrer durant leur séjour dans les côlons des porcelets. Ils sont sécrétés dans le contenu luminal à proximité de l'intestin grêle (de Vries, *et al.*, 2005). L'étude de la diffusion des sels biliaires à travers le sachet de dialyse *in vitro* était alors nécessaire.

5 ml d'eau distillé ont été injectés dans un dispositif de dialyse qui a été ensuite introduit dans un bécher contenant 1L de solution de sels biliaires (Sigma Aldrich) à 1g/l. La diffusion des sels biliaires à travers la membrane de dialyse a été mise en évidence par un suivi de DO au fil du temps. 1 ml de solution dans le dispositif a été aspiré pour faire une mesure de DO_{201nm} puis il a été réinjecté dans dispositif. Cette étude montre que les sels biliaires diffusent à travers la membrane en atteignant un équilibre entre les deux milieux (extérieur et intérieur du dispositif de dialyse) au bout de 5 heures de dialyse (figure 2D)

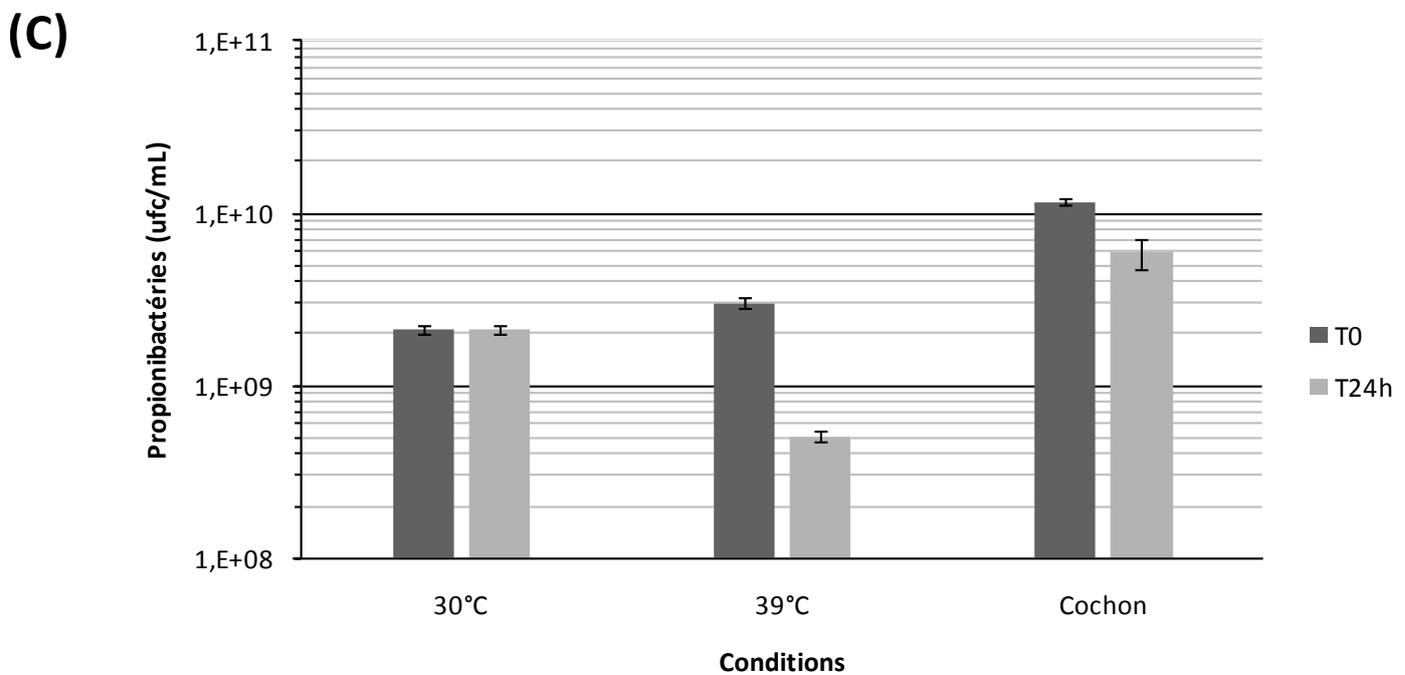
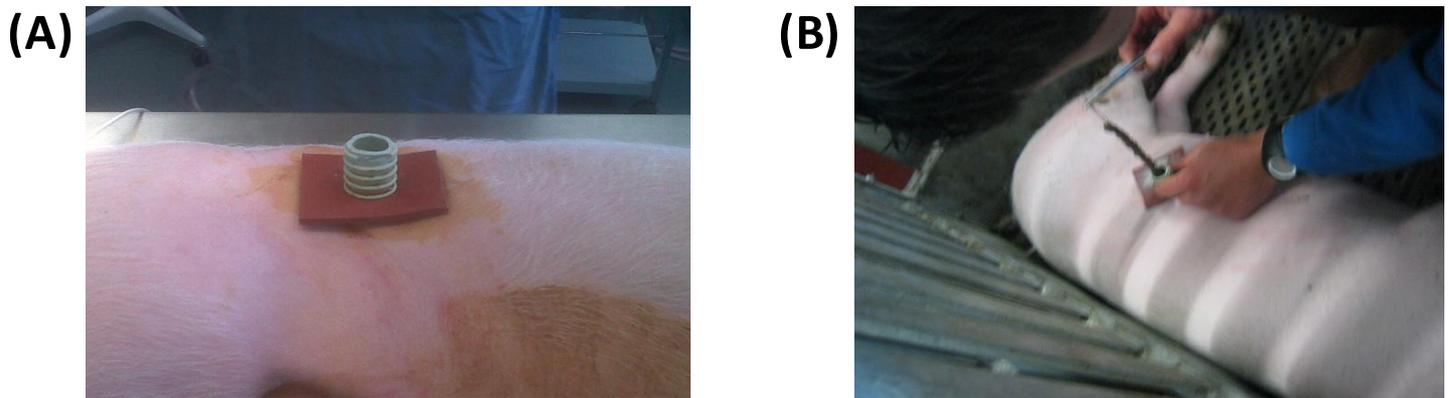


Figure 3 : Le milieu colique permet la survit de *P. freudenreichii* CIRM-BIA-1 malgré la température de 39 C.

(A) : Flan droit d'un porcelet montrant la canule colique extériorisée.

(B) : Retrait du sachet de dialyse contenant une culture de *P. freudenreichii* CIRM-BIA-1 en phase stationnaire et ayant séjournée 24 heures dans le côlon du porc.

(C) : La souche *P. freudenreichii* CIRM-BIA-1 a été cultivée dans du YEL à 30 C jusqu'à phase stationnaire. Les cultures sont alors transférées soit dans des tubes qui ont ensuite été incubés 24 heures à 30 C ou à 39 C, soit introduites dans des sachets de dialyse qui ont été mis pendant 24 heures dans le colon de porcelets. 12 cultures ont été réalisées pour chaque condition.

La perte de viabilité a été étudiée en faisant les moyennes et les écarts types des numérations sur milieu YELA avant et après que les cultures bactériennes aient séjourné 24 heures à 30 C, à 39 C ou dans le côlon.

IV-4. *P. freudenreichii* CIRM-BIA 1 s'adapte à l'environnement colique

L'analyse statistique des données de transcriptomique nécessitent un nombre de réplicats biologique au moins égale à 12 (Grégory Guernec, plateforme INRA SCRIBE). Nous avons réalisé 16 cultures bactériennes (4 cultures par jours) qui ont séjourné 24h dans le côlon des porcelets. Des numérations ont été réalisées sur milieux YELA, avant introduction dans le côlon est après récupération des cultures (après 24h dans le côlon). Des numérations ont été aussi réalisées sur les 12 cultures bactériennes qui ont été mise 24h à 30°C et sur les 12 cultures mise 24h à 39°C.

La moyenne des numérations a été calculée et représenté en histogrammes avec les écarts types en barres d'erreur (Figure 3C). Les résultats montrent que la population bactérienne des cultures qui ont passé 24h à 30°C est restée stable. Alors que dans les cultures ayant séjournées 24h dans le côlon des porcelets, on remarque une perte de viabilité qui est négligeable en comparaison avec la perte de viabilité remarquée sur les cultures ayant passé 24 h à 39°C. La perte de viabilité à 39°C est de plus de 90% de la population bactérienne. Cela laisse supposer que les bactéries ont trouvé un moyen pour lutter contre le choc thermique qu'elles subissent dans le côlon des porcelets. Cela peut être dû au fait que :

- Les bactéries ont exprimé un ou plusieurs facteurs de survie. Ces facteur peuvent être des chaperonnes tels que: GroEL, GroES, Clp... qui ont été précédemment identifiées comme induites par les bactéries probiotiques durant un stress acide, un stress biliaire ou dans les systèmes digestif (2, 15, 17, 38).
- Une partie des bactéries s'est suicidée libérant ainsi leur contenu cytoplasmique. Les bactéries vivantes récupèrent ce contenu et l'utilisent comme nutriments. Comme il a été prouvé par Koshenniemi et collaborateur en 2011 chez le *Lb. rhamnosus* GG.
- Au fait que la bactérie exprime dans le côlon du porcelet des mécanismes intervenant dans l'acquisition et le transport du nutriment. Ces mécanismes sont induits par les bactéries probiotiques durant un stress acide, un stress biliaire ou dans le système digestif (2, 17, 24, 27, 35, 38).

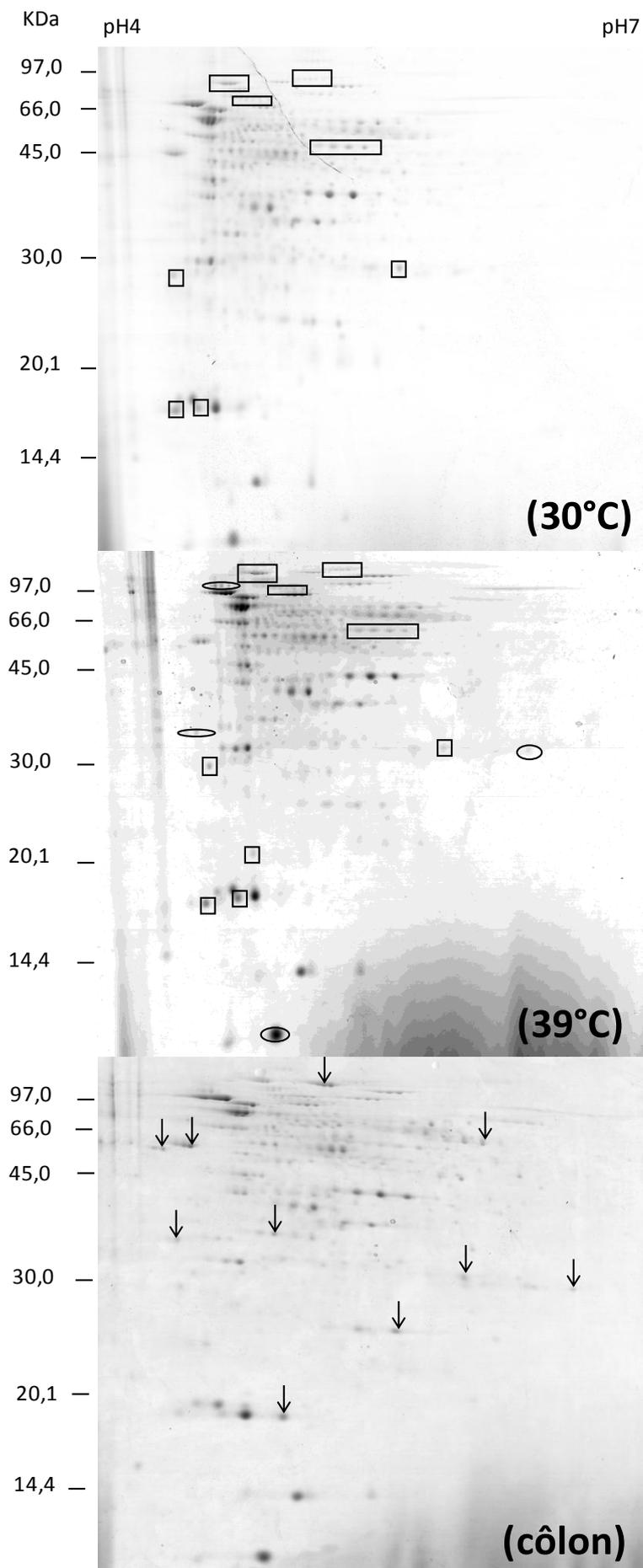


Figure 4: L'expression des protéines de *P. freudenreichii* CIRM-BIA-1 est modulée en fonction de l'environnement et la de la température. 12 cultures de *P. freudenreichii* CIRM-BIA-1 ont été réalisées sur du YEL à 30°C jusqu'à phase stationnaire (72h). Ces cultures ont été alors transférées soit dans des tubes qui ont été ensuite incubés 24 heures à 30°C ou à 39°C ou introduites dans des sachets de dialyse qui ont été mis pendant 24 heures dans le còlon du porcelet. Le profil protéique a été analysé par électrophorèse bidimensionnelle.

- Protéines sous-exprimées dans le còlon
- Protéines surexprimées à 39 C par rapport à 30 C
- ↓ Protéines surexprimées dans le còlon

IV-5. L'expression des protéines de *P. freudenreichii* varie avec les conditions de culture

Le profil électrophorétique des protéines extraites de culture de *P. freudenreichii* dans les 3 conditions (30°C, 39°C et côlon des porcelets) a été étudié par électrophorèse bidimensionnelle (Figure 4). Les gels obtenus montrent une différence entre les profils des trois différentes conditions de cultures. Il y a des protéines qui sont surexprimées et d'autre réprimées dans les cultures ayant séjournées dans le côlon comparé aux cultures à 30°C et à 39°C. D'autres protéines sont surexprimées à 39°C en comparaison des cultures à 30°C.

Aucun spot correspondant à des protéines surexprimées dans les cultures à 39°C en comparaison avec des cultures dans le côlon n'a été identifié sur les gels. Cela est sûrement dû au fait que la température interne du porcelet est de 39°C. Il y'a par contre des spots correspondant à des protéines surexprimées dans les cultures dans le côlon en comparaison au culture à 39°C. Cela prouve que dans le côlon des porcelets, *P. freudenreichii* subie d'autre stress ue le stress thermique (39°C).

Ces résultats montrent que *P. freudenreichii* module l'expression de ces protéines en fonction de l'environnement. Ils sont en accord avec la réactivité de *P. freudenreichii* décrite auparavant in vitro.

IV-6. *P. freudenreichii* conserve une activité métabolique dans l'environnement colique

L'activité métabolique est liée à la présence et l'intégrité des ARN dans la cellule bactérienne. Par exemple, la transcription d'une transcarboxylase chez *Propionibacterium ssp* lors de son passage à travers le système digestif a permis de prouver que la bactérie y était encore active métaboliquement (13).

A. Quantification des ARN totaux.

La quantité d'ARN totaux extrait dans les différentes conditions a été dosée par spectrophotométrie dans l'UV (Nanodrop). Le résultat obtenu montre une quantité d'ARN entre 339,9 et 454,14 ng/μl pour les cultures à 30°C, entre 70,4 et 108,68 ng/μl pour les cultures à 39°C et entre 333,24 et 860,47 ng/μl dans les cultures ayant séjourné dans le côlon des porcelets. Le nombre différents de cellules utilisées lors de l'extraction ne permet pas l'interprétation des résultats. Pour cela une normalisation a été réalisée. Toutes les quantités d'ARN ont été ramenées par calcul à une quantité de cellules de 10⁹ UFC (Tableaux I). Cette normalisation a permis de remarquer que les ARN extraits des cultures à 39°C et à 30°C sont de concentration identique. Les concentrations des ARN extraits des cultures dans le côlon des porcelets en revanche sont très

variables allant de 138 ng à 920 ng. Cela est du notamment à la variation de l'état physiologique des porcelets et à la variation génétique entre les différents porcelets

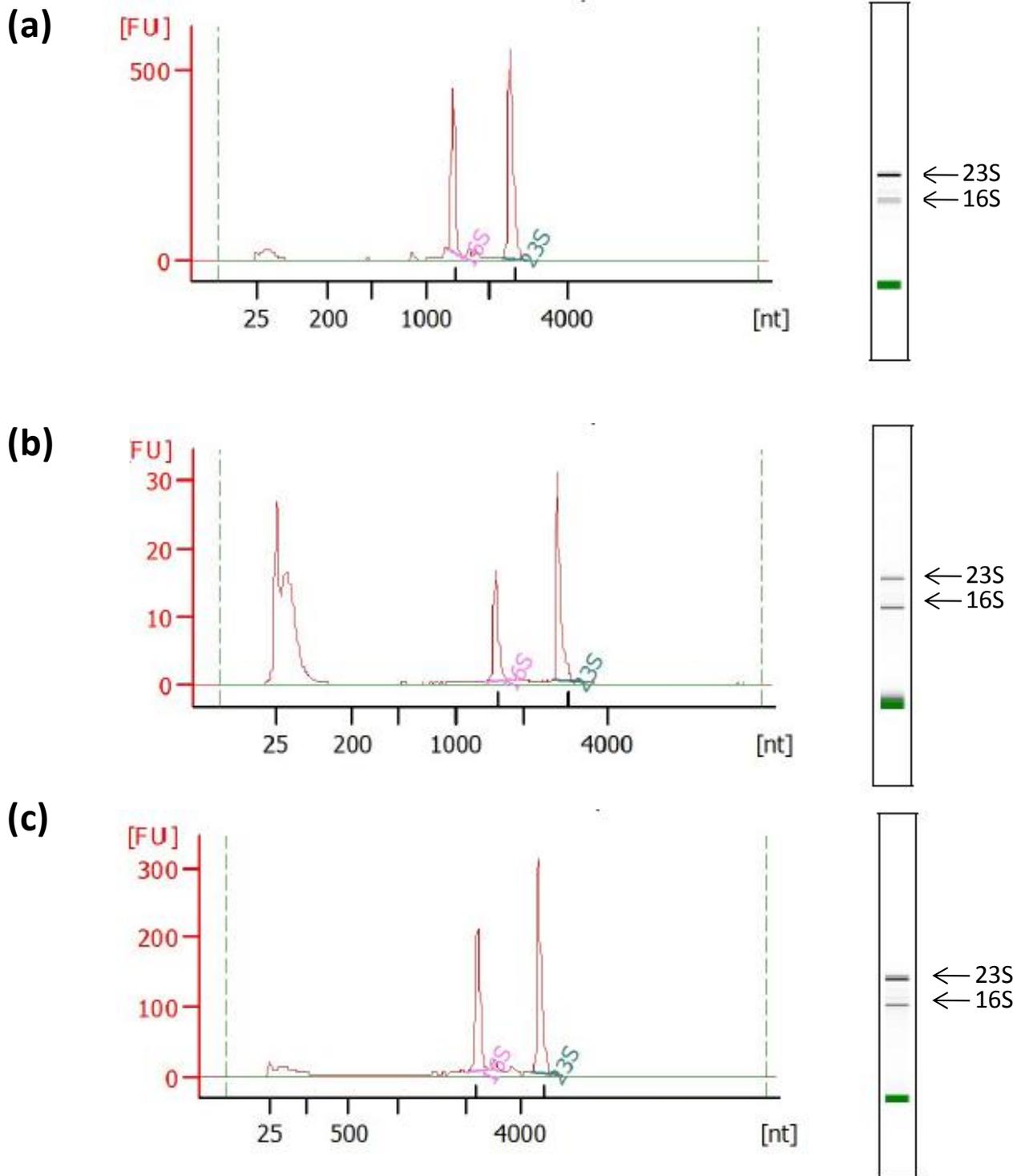


Figure 5 : Les ARN extrait de l'environnement colique ne sont pas dégradés.

12 cultures de *P. freudenreichii* CIRM-BIA-1 ont été réalisées sur du YEL à 30°C jusqu'à phase stationnaire (72h). Ces cultures ont été alors transférées soit dans des tubes qui ont été ensuite incubés 24 heures à 30°C (a) ou à 39°C (b), ou introduites dans des sachets de dialyse qui ont été mis pendant 24 heures dans le colon de porc (c).

Le profil électrophorétique des préparations d'ARN de ses cultures a été établi sur puce bioanalyseur; Les résultats sont présentés sous forme comparable à un électrophorégramme (pics) ou comparable à celle d'un gel (bande). Les ARN ribosomiaux (23S et 16S) apparaissent non dégradés (intégrés): pics bien définis et bandes nettes (sans smear)

Cette normalisation a aussi permis de remarquer que la quantité d'ARN varie en fonction du nombre de cellules bactériennes utilisées lors de l'extraction.

Le dosage des ARN au Nanodrop nous à aussi permis de voir la pureté de nos ARN. Cette pureté est calculée par le rapport DO_{260nm}/DO_{280nm} et DO_{260nm}/DO_{230nm} (Tableau I). L'ARN absorbant à 260nm et les protéines à 230 et 280 (Tableaux). Plus le rapport est proche de 2 plus la pureté des ARN est importante.

B. La validation des ARN totaux.

Pour la validation des ARN, leur profil électrophorétique a été établi sur puce Bioanalyseur. Les résultats sont présentés sous forme comparable à un électrophorégramme (pics) ou comparable à celle d'un gel (bande). La majorité des ARN ribosomiaux (23S et 16S) extraits dans les trois conditions de cultures : 30°C, 39°C et dans le côlon des porcelets, apparaissent non dégradés (intègres): pics bien définis et bandes nettes (sans smear) (Figure 5).

ARN. Sa valeur va de 1 (ARN complètement dégradé) à 10 (ARN intact). Son seuil d'acceptabilité dépend de la technique d'analyse du transcriptome utilisée en aval (en général, RIN >7.5 pour une puce à ADN et RIN > 6 pour une PCRq). Le RIN des ARN des cultures à 30°C \approx 10 (ARN intact), ceux des ARN des cultures dans le cochon sont en majorités supérieur à 7.4 (ARN intact) sauf pour trois extractions (couleur rouge dans le Tableau I). L'ARN dégradé, peut être du à un problème d'extraction ou à l'état physiologique des bactéries dans le côlon des porcelets.

Par contre pour les ARN des cultures à 39°C, le RIN n'a pas été calculé (N/A). Cela est du soit à une erreur du logiciel soit au fait que les concentrations d'ARN été trop faibles.

La quantité et l'intégrité des ARN totaux montrent la présence d'ARN messenger intact dans les cultures ayant séjourné 24h dans le côlon des porcelets. De ce fait et du fait de la courte demi vie des ARN messenger nous pouvons conclure que l'activité métabolique de *P. freudenreichii* est conservée lors de son séjour dans le côlon des porcelets.

C. Quantification des transcrits par l'hybridation sur puce à ADN

Pour réaliser une analyse de l'expression des gènes procaryotes par puce à ADN, 5 μ g d'ARN est nécessaire. Après purification des ARN, on récupère 50 μ l d'échantillon avec des concentrations exprimées en mg/ μ l dans le Tableau I. Les quantités d'ARN que nous avons à notre disposition permettent l'analyse par puce à ADN des ARN issue des cultures à 30°C et du côlon des porcelets et non de celles issues des cultures à 39°C. Pour cela les extractions des ARN des cultures à 39°C ont été refaites.

Tableaux I : La majorité des ARN extraite de culture de *P. freudenreichii* CIRM-BIA-1 ont une quantité et qualité suffisante pour une analyse transcriptomique par puce à ADN.

Tableau résumant la quantité, la pureté et l'intégrité des ARN extrait de culture de *P. freudenreichii* CIRM-BIA-1 (phase stationnaire + 24 heures à 30°C, à 39°C ou dans le côlon du Porc). Analyse par spectrophotométrie dans les Ultra-violet (Nanodrop).

Condition	ufc/ml	ng/ul d'ARN	ng/ul d'ARN après normalisation	260/280	260/230	RIN
culture à 30°C	2,00E+09	397,15	198,58	1,97	2,17	9,9
	2,20E+09	400,43	182,01	1,96	2,13	10
	2,10E+09	389,06	185,27	1,95	2,14	9,3
	2,70E+09	339,3	125,67	1,99	2,13	9,5
	1,80E+09	436,29	242,38	1,95	2,13	9,9
	1,80E+09	406,39	225,77	1,97	2,14	10
	2,50E+09	454,14	181,66	1,96	2,03	N/A
	1,50E+09	387,89	258,59	1,94	1,93	9,8
	2,50E+09	399,32	159,73	1,98	2,16	10
	2,40E+09	395,72	164,88	1,94	2,12	10
	1,88E+09	420,78	223,82	1,97	2,12	10
	2,00E+09	387,94	193,97	2	2	10
culture à 39°C	6,70E+08	91,64	136,78	1,74	2,03	N/A
	5,60E+08	105,84	189,00	1,72	1,98	N/A
	3,60E+08	102,49	284,69	1,65	1,97	N/A
	3,80E+08	70,4	185,26	1,7	1,99	6,3
	4,20E+08	90,14	214,62	1,66	1,91	N/A
	4,00E+08	98,31	245,78	1,69	1,89	N/A
	4,20E+08	96,47	229,69	1,7	1,98	N/A
	6,60E+08	81,91	124,11	1,66	1,9	N/A
	4,90E+08	108,68	221,80	1,69	1,98	N/A
	6,10E+08	90,93	149,07	1,68	1,5	N/A
	6,70E+08	99,58	148,63	1,66	1,81	8,3
	4,70E+08	98,61	209,81	1,61	1,72	N/A
culture dans le côlon de porcelet	2,82E+09	559,88	198,35	1,93	1,97	7,4
	2,34E+09	860,47	368,08	1,92	2,16	8,9
	9,74E+08	197,35	202,68	1,88	1,57	7,5
	2,68E+09	452,52	169,03	1,86	1,54	2,3
	3,06E+09	422,92	138,18	1,92	2,12	9,3
	1,07E+09	596,64	557,82	1,92	2,08	8,6
	1,57E+09	397,7	253,54	1,87	2,06	6,3
	9,74E+08	370,91	380,77	1,9	1,93	4,3
	1,86E+09	414,55	223,39	1,74	1,22	9,9
	1,30E+09	453,81	350,16	1,92	2,07	8,3
	2,94E+09	610	207,65	1,96	2,18	9,4
	5,24E+08	390,63	745,76	1,95	2,09	9,3
	1,04E+09	333,24	321,57	1,94	1,98	9,3
	1,40E+09	392,52	281,03	1,95	2,12	9,3
	3,96E+08	364,1	919,44	1,93	2,14	9,3
2,32E+09	447,34	192,55	1,88	1,85	9,9	

La faible quantité d'ARN obtenue est due à la quantité de bactéries revivifiables (UCF) utilisées qui est 10 fois moindre que dans les autres conditions. Le fait de prendre une quantité bactérienne 10 x supérieur semblait être une bonne perspective. Pour cela l'extraction des ARN a été réalisée en prenant 10 ml (au lieu de 1 ml) de cultures de *P. freudenreichii* en phase stationnaire (72h à 30°C) + 24h à 39°C. 12 cultures différentes ont été réalisées. Cette nouvelle expérience n'a pas donné les résultats souhaités. Le dosage d'ARN aux Nanodrop a donné des concentrations d'ARN de 15 ng/ul à 30 ng/ul. Cela est dû au fait que les acides nucléiques (particulièrement l'ADN) ont colmaté la colonne lors de l'extraction. La quantité élevée d'ADN pourrait être due à la présence de cellules mortes (non revivifiables).

Après cet échec, une autre perspective a ensuite été réalisée. Cette fois-ci, 12 cultures différentes de *P. freudenreichii* en phase stationnaire (72h à 30°C) + 24h à 39°C ont été réalisées. Ensuite deux extractions d'ARN à partir de 1 ml de cultures ont été réalisées sur chacune des 12 cultures. Après extraction et purification d'ARN, les 2 échantillons d'extraction d'ARN de chaque culture ont été mélangés puis concentrés. La concentration des ARN a été réalisée par utilisation d'une colonne de concentration (MiniElute, Qiagen) selon le protocole du fournisseur.

I. Conclusion et perspectives

Les probiotiques ont un rôle clé à jouer, en appui aux thérapies classiques, dans le domaine de certaines pathologies croissantes dans les pays industrialisés. L'étude des mécanismes d'adaptation de la bactérie *P. freudenreichii* à l'environnement colique vise à comprendre ses capacités de survie lors de son séjour dans le tractus gastro-intestinal semble nécessaire. Pour cela, durant se stage un dispositif de dialyse a été réalisé afin de permettre de le séjour d'une culture pure de *P. freudenreichii* dans le côlon de porcelets.

Les résultats obtenus montrent une capacité de survie de la bactérie dans le contenu colique, qui est sûrement liée à des facteurs d'adaptation ou de croissance. En effet l'expression des protéines est modulée par l'environnement. Ainsi il y a des protéines différenciellement exprimées entre les *P. freudenreichii* présente dans le côlon des porcelets, et celle cultivées en bouillon à 30°C ou à 39°C.

Le résultat obtenu montre aussi que *P. freudenreichii* conserve une activité métabolique dans le côlon des porcelets. Cela est suggéré par la présence d'ARN (demi-vie courte) intègre dans les cultures bactériennes ayant séjourné dans le côlon des porcelets.

Tous c'est résultats au cours de ce stage ouvrent des perspectives de recherche pour le laboratoire STLO :

- L'identification des protéines différenciellement exprimées dans le côlon des porcelets est actuellement faite par une analyse par spectrométrie de masse.
- L'identification des gènes différenciellement exprimées dans le côlon des porcelets par analyse sur puce à ADN est prévue en 2011.
- Les résultats obtenus par l'analyse des puces seront confirmés par des analyses en RT-PCR quantitative pour les gènes clés.

A terme, une meilleure compréhension des mécanismes d'adaptation aux stress digestifs sera possible. Cela permettra d'améliorer les performances de la bactérie en vue des études précliniques et cliniques.

Références bibliographique

1. **Angelichio, M. J. and A. Camilli.** 2002. In vivo expression technology. *Infect. Immun.* **70**:6518-6523.
2. **Bron, P. A., C. Grangette, A. Mercenier, W. M. de Vos, and M. Kleerebezem.** 2004. Identification of *Lactobacillus plantarum* genes that are induced in the gastrointestinal tract of mice. *J. Bacteriol.* **186**:5721-5729.
3. **Bron, P. A., M. Marco, S. M. Hoffer, M. E. Van, W. M. de Vos, and M. Kleerebezem.** 2004. Genetic characterization of the bile salt response in *Lactobacillus plantarum* and analysis of responsive promoters in vitro and in situ in the gastrointestinal tract. *J. Bacteriol.* **186**:7829-7835.
4. **Bron, P. A., D. Molenaar, W. M. de Vos, and M. Kleerebezem.** 2006. DNA micro-array-based identification of bile-responsive genes in *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Microbiol.* **100**:728-738.
5. **Butler, J. E. and M. Sinkora.** 2007. The isolator piglet: a model for studying the development of adaptive immunity. *Immunol. Res.* **39**:33-51.
6. **Calder, P. C., S. Krauss-Etschmann, E. C. de Jong, C. Dupont, J. S. Frick, H. Frokiaer, J. Heinrich, H. Garn, S. Koletzko, G. Lack, G. Mattelio, H. Renz, P. T. Sangild, J. Schrezenmeir, T. M. Stulnig, T. Thymann, A. E. Wold, and B. Koletzko.** 2006. Early nutrition and immunity - progress and perspectives. *Br. J. Nutr.* **96**:774-790.
7. **Cappa, F., D. Cattivelli, and P. S. Cocconcelli.** 2005. The *uvrA* gene is involved in oxidative and acid stress responses in *Lactobacillus helveticus* CNBL1156. *Res. Microbiol.* **156**:1039-1047.
8. **Cousin, F. J., D. Mater, B. Foligne, and G. Jan.** 2011. Dairy propionibacteria as human probiotics: A review of recent evidence. *Dairy Sci. Technol.* **91**:1-26.
9. **de Vries, M. C., E. E. Vaughan, M. Kleerebezem, and W. M. de Vos.** 2005. *Lactobacillus plantarum* survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *Int. Dairy Journal* **16**:1018-1028.
10. **Denou, E., R. D. Pridmore, B. Berger, J. M. Panoff, F. Arigoni, and H. Brussow.** 2008. Identification of genes associated with the long-gut-persistence phenotype of the probiotic *Lactobacillus johnsonii* strain NCC533 using a combination of genomics and transcriptome analysis. *J. Bacteriol.* **190**:3161-3168.
11. **Duary, R. K., V. K. Batish, and S. Grover.** 2010. Expression of the *atpD* gene in probiotic *Lactobacillus plantarum* strains under in vitro acidic conditions using RT-qPCR. *Res. Microbiol.* **161**:399-405.
12. **Gueimonde, M., C. Garrigues, S. D. van, de Los Reyes-Gavilan CG, and A. Margolles.** 2009. Bile-inducible efflux transporter from *Bifidobacterium longum* NCC2705, conferring bile resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**:3153-3160.
13. **Herve, C., M. Fondrevez, A. Cheron, F. Barloy-Hubler, and G. Jan.** 2007. Transcarboxylase mRNA: a marker which evidences *P. freudenreichii* survival and metabolic activity during its transit in the human gut. *Int J Food Microbiol.* **113**:303-314.
14. **HJERTEN, S.** 1962. "Molecular sieve" chromatography on polyacrylamide gels, prepared according to a simplified method. *Arch. Biochem. Biophys.* **Suppl 1**:147-151.
15. **Jan, G., P. Leverrier, V. Pichereau, and P. Boyaval.** 2001. Changes in protein synthesis and morphology during acid adaptation of *Propionibacterium freudenreichii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:2029-2036.
16. **Jin, J., S. Liu, L. Zhao, K. Ge, X. Mao, and F. Ren.** 2011. Changes in *ffh*, *uvrA*, *groES* and *dnaK* mRNA abundance as a function of acid-adaptation and growth phase in *Bifidobacterium longum* BBMN68 isolated from healthy centenarians. *Curr. Microbiol.* **62**:612-617.
17. **Koskenniemi, K., K. Laakso, J. Koponen, M. Kankainen, D. Greco, P. Auvinen, K. Savijoki, T. A. Nyman, A. Surakka, T. Salusjarvi, W. M. de Vos, S. Tynkkynen, N. Kalkkinen, and P. Varmanen.** 2011. Proteomics and transcriptomics characterization of bile stress response in probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Mol. Cell Proteomics.* **10**:M110.

18. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
19. **Lebeer, S., J. Vanderleyden, and S. C. De Keersmaecker.** 2008. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**:728-764.
20. **Lebeer, S., J. Vanderleyden, and S. C. De Keersmaecker.** 2010. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**:171-184.
21. **Lee, K., H. G. Lee, K. Pi, and Y. J. Choi.** 2008. The effect of low pH on protein expression by the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri*. *Proteomics.* **8**:1624-1630.
22. **Lee, K. and K. Pi.** 2010. Effect of transient acid stress on the proteome of intestinal probiotic *Lactobacillus reuteri*. *Biochemistry (Mosc.)* **75**:460-465.
23. **Leverrier, P., D. Dimova, V. Pichereau, Y. Auffray, P. Boyaval, and G. Jan.** 2003. Susceptibility and adaptive response to bile salts in *Propionibacterium freudenreichii*: physiological and proteomic analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:3809-3818.
24. **Leverrier, P., J. P. Vissers, A. Rouault, P. Boyaval, and G. Jan.** 2004. Mass spectrometry proteomic analysis of stress adaptation reveals both common and distinct response pathways in *Propionibacterium freudenreichii*. *Arch. Microbiol.* **181**:215-230.
25. **Lim, E. M., S. D. Ehrlich, and E. Maguin.** 2000. Identification of stress-inducible proteins in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Electrophoresis* **21**:2557-2561.
26. **Lorca, G. L., d. Font, V, and A. Ljungh.** 2002. Characterization of the protein-synthesis dependent adaptive acid tolerance response in *Lactobacillus acidophilus*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **4**:525-532.
27. **Marco, M. L., M. C. de Vries, M. Wels, D. Molenaar, P. Mangell, S. Ahrne, W. M. de Vos, E. E. Vaughan, and M. Kleerebezem.** 2010. Convergence in probiotic *Lactobacillus* gut-adaptive responses in humans and mice. *ISME. J.* **4**:1481-1484.
28. **Moslehi-Jenabian, S., K. Gori, and L. Jespersen.** 2009. AI-2 signalling is induced by acidic shock in probiotic strains of *Lactobacillus* spp. *Int. J. Food Microbiol.* **135**:295-302.
29. **Pang, X., X. Hua, Q. Yang, D. Ding, C. Che, L. Cui, W. Jia, P. Bucheli, and L. Zhao.** 2007. Inter-species transplantation of gut microbiota from human to pigs. *ISME. J.* **1**:156-162.
30. **Perez Chaia, A., M. E. N. de Macias, and G. Oliver.** 1995. Propionibacteria in the gut: Effect on some metabolic activities of the host. *Lait* **75**:435-445.
31. **Sanchez, B., M. C. Champomier-Verges, P. Anglade, F. Baraige, de Los Reyes-Gavilan CG, A. Margolles, and M. Zagorec.** 2005. Proteomic analysis of global changes in protein expression during bile salt exposure of *Bifidobacterium longum* NCIMB 8809. *J. Bacteriol.* **187**:5799-5808.
32. **Sanchez, B., M. C. Champomier-Verges, B. Stuer-Lauridsen, P. Ruas-Madiedo, P. Anglade, F. Baraige, de Los Reyes-Gavilan CG, E. Johansen, M. Zagorec, and A. Margolles.** 2007. Adaptation and response of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* to bile: a proteomic and physiological approach. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:6757-6767.
33. **Thierry, A., M. B. Maillard, C. Herve, R. Richoux, and S. Lortal.** 2004. Varied volatile compounds are produced by *Propionibacterium freudenreichii* in Emmental cheese. *Food Chem.* **87**:439-446.
34. **Wall, T., K. Bath, R. A. Britton, H. Jonsson, J. Versalovic, and S. Roos.** 2007. The early response to acid shock in *Lactobacillus reuteri* involves the ClpL chaperone and a putative cell wall-altering esterase. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:3924-3935.
35. **Walter, J., P. Chagnaud, G. W. Tannock, D. M. Loach, B. F. Dal, H. F. Jenkinson, W. P. Hammes, and C. Hertel.** 2005. A high-molecular-mass surface protein (Lsp) and methionine sulfoxide reductase B (MsrB) contribute to the ecological performance of *Lactobacillus reuteri* in the murine gut. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:979-986.
36. **Walter, J., N. C. Heng, W. P. Hammes, D. M. Loach, G. W. Tannock, and C. Hertel.** 2003. Identification of *Lactobacillus reuteri* genes specifically induced in the mouse gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:2044-2051.
37. **Walter, J., D. M. Loach, M. Alqumber, C. Rockel, C. Hermann, M. Pfitzenmaier, and G. W. Tannock.** 2007. D-alanyl ester depletion of teichoic acids in *Lactobacillus reuteri* 100-23 results in impaired colonization of the mouse gastrointestinal tract. *Environ. Microbiol.* **9**:1750-1760.

38. Yuan, J., B. Wang, Z. Sun, X. Bo, X. Yuan, X. He, H. Zhao, X. Du, F. Wang, Z. Jiang, L. Zhang, L. Jia, Y. Wang, K. Wei, J. Wang, X. Zhang, Y. Sun, L. Huang, and M. Zeng. 2008. Analysis of host-inducing proteome changes in *Bifidobacterium longum* NCC2705 grown in Vivo. *J. Proteome. Res.* **7**:375-385.