



**HAL**  
open science

## les propionibactéries lactières, des bactéries particulières.

Gwénaél Jan

► **To cite this version:**

Gwénaél Jan. les propionibactéries lactières, des bactéries particulières.. Invitation INRA TOXALIM, Institut National de Recherche Agronomique (INRA). UMR Toxicologie Alimentaire (1331)., Feb 2019, Toulouse, France. hal-02051585

**HAL Id: hal-02051585**

**<https://hal.science/hal-02051585>**

Submitted on 5 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.



# Les propionibactéries laitières, des bactéries particulières...



**Gwénaél JAN**

UMR 1253 STLO

INRA Agrocampus Ouest, Rennes, France



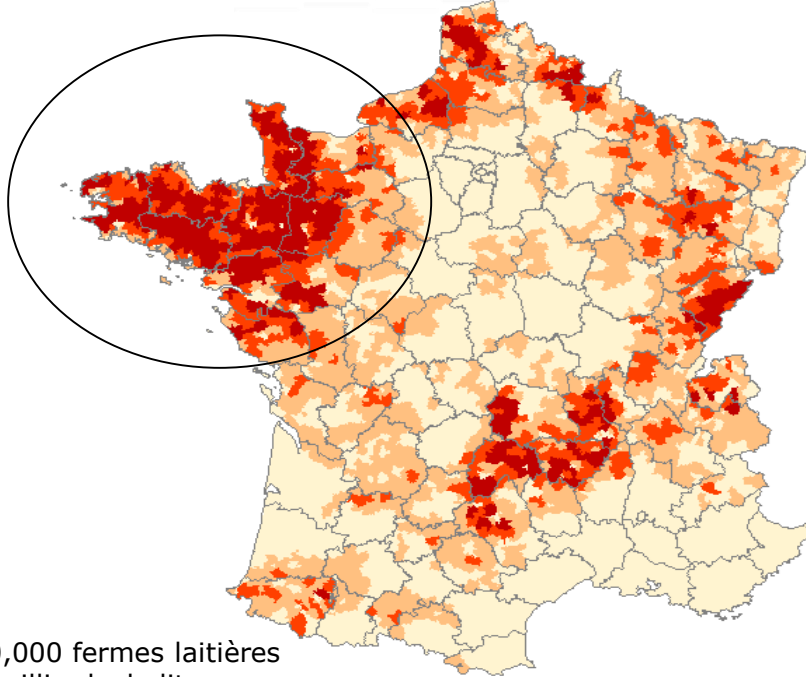


# L'UMR STLO, en quelques mots ...



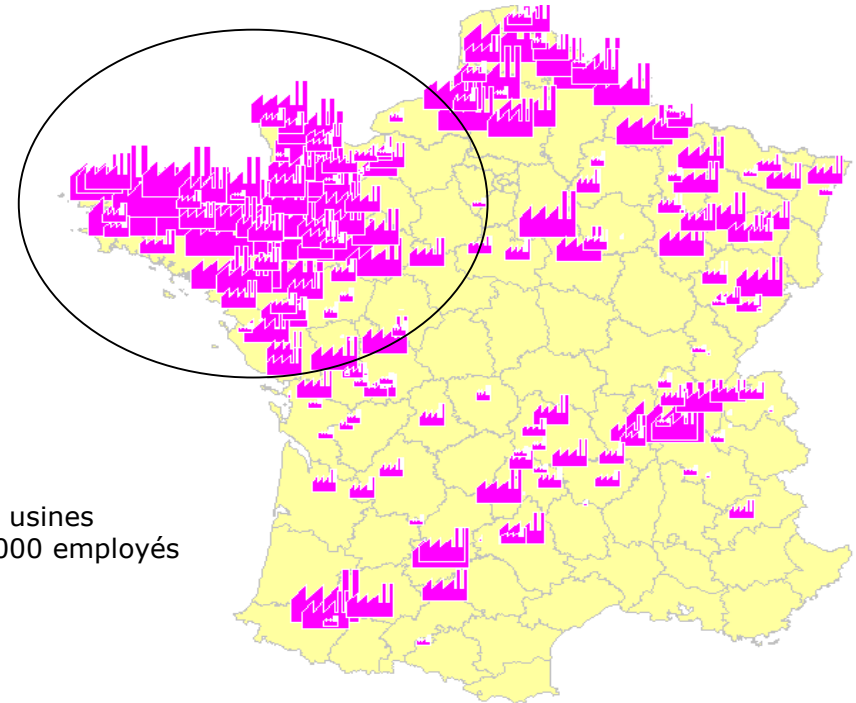


## Production laitières en France (3.8 millions de vaches laitières)



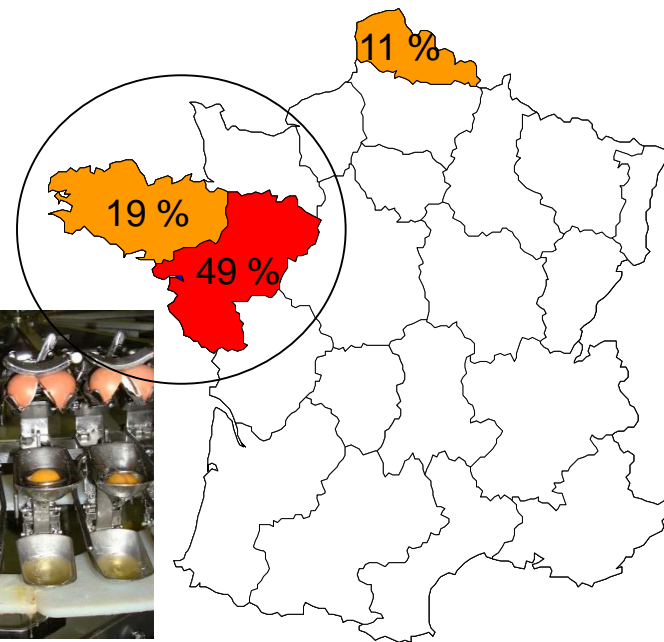
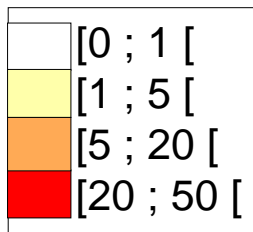
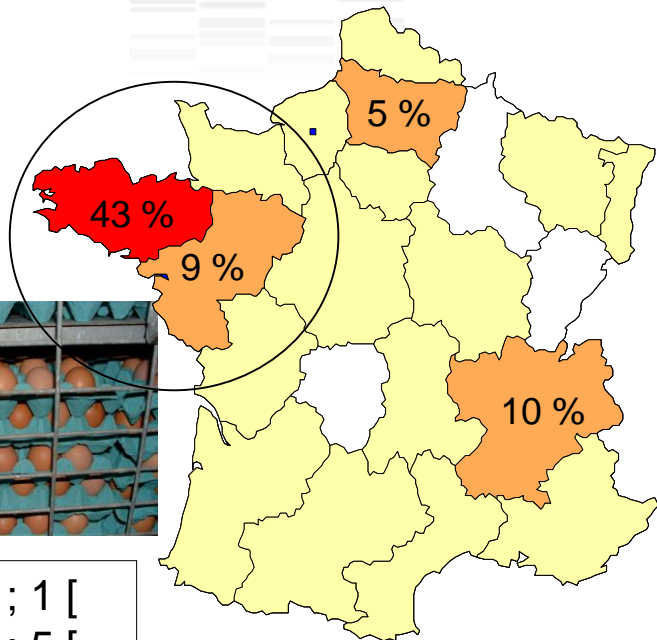
100,000 fermes laitières  
22 milliards de litres  
200,000 emplois directs

## Traitement & transformation



700 usines  
60,000 employés

# Les œufs ...



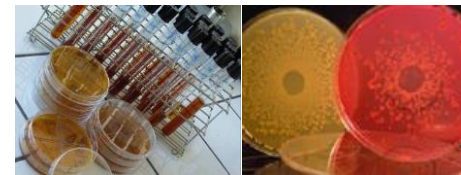


## Une approche pluridisciplinaire et multi-échelle, renforcée par deux installations d'envergure :

La plateforme Lait



Un centre de ressources biologiques



- ❑ Structuration et mécanismes de déstructuration des matrices alimentaires :  
*de la caractérisation structurale à la digestion*
- ❑ Procédés de l'industrie laitière et fabrication fromagère :  
*vers de systèmes durables*
- ❑ **Interactions microbiennes :**  
*matrice alimentaire et cellules de l'hôte*

Pour visiter notre site <http://www6.rennes.inra.fr/stlo>



## 2 outils technologiques majeurs:

### Plateforme lait & centre de ressource biologique



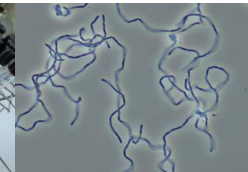
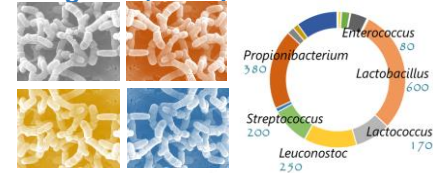
- **Pilote plant** dedicated to dairy technology
- 800 m<sup>2</sup>, fully **renewed in 2013 (700 k€)**
- Equipements at a pre-industrial scale, which cover **80 % of the processes used in the dairy industry**
  - Continuum over the whole transformation chain for milk treatment
  - **Continuum from research to pre-industrial validation**
- A tool for students' training



Biological Resource Center for **Food**

**Bacteria (CIRM-BIA)**

4 000 strains, of which 2000 are referenced in an online catalogue (<http://collection-cirmbia.fr>)  
**23 genera, 113 species**



## Des partenaires industriels

### 38 contrats de recherche avec des partenaires industriels

Dairy: BBA members + Ingredia, HCI, UP, Ermitage, Danone...  
Equipment suppliers: GEA (Fr & Dk), Tetrapak (NL)  
Non-dairy: ADRO Ouest members, DSM, Lesaffre, Vapran (blood), AdroOuest (Oeuf), Standa,

### 4 contrats avec des partenaires étrangers

Valio, Unilever, Mondelez, Arla Food

### 16 Contrats de thèse Cifre

## Organisations interprofessionnelles

(CA, CS, instance progr.)



**Bba**

*Fromageries Bel, Bongrain, CF&R, Entremont Alliance, Eurial, Coopérative d'Isigny-Ste-Mère, Lactalis, Laïta, Laiterie de Montaigu, SILL, Maîtres Laitiers du Cotentin*

## Instituts techniques

Actalia  
RMT Lislral  
RMT Fromages de terroir

## Clusters (Pôles de compétitivité)

Commissions thématiques





## Cinq équipes de recherche complémentaires



## Microbiologie des filières lait et œuf

Nos travaux visent en particulier à :

**Développer des aliments sains, sûrs, hédoniques et fonctionnels (bactéries lactiques et propioniques)** issus de la fermentation du lait et d'autres matières premières (e.g. mixtes végétaux-lait)

**Développer des aliments à effet santé pour l'homme (probiotiques)**

Réduire les risques sanitaires et l'altération des œufs et des ovoproduits (e.g. *Salmonella enteritidis*, *Bacillus cereus*)

Prévenir les mammites en proposant des alternatives aux traitements antibiotiques (e.g. *Staphylococcus aureus*, microbiote mammaire)

<http://www6.rennes.inra.fr/stlo>



# Le fromage, une vieille histoire ...



# Qui débute avec la domestication d'animaux source de lait - néolithique, 5000 avant JC



*"les premières espèces domestiquées furent la chèvre, le mouton, le porc et le boeuf... elles l'ont toutes été à peu près en même temps, vers 8 500 avant J.-C., au Proche-Orient."*



Moule à fromage de la grotte de la Pileta, Malaga

→ le fromage est le plus ancien aliment façonné par l'homme, avant le pain et le vin!

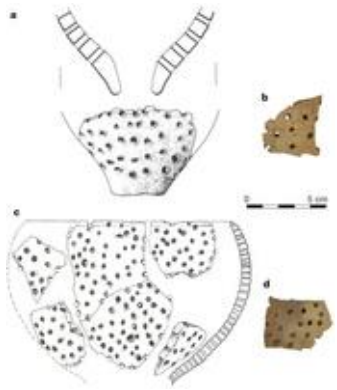
# Qui débute avec la domestication d'animaux source de lait - néolithique, 5000 avant JC

## Earliest evidence for cheese making in the sixth millennium bc in northern Europe

[Salque M<sup>1</sup>](#), [Bogucki PI](#), [Pyzel J](#), [Sobkowiak-Tabaka I](#), [Grygiel R](#), [Szmyt M](#), [Evershed RP](#).

**Salque et al.,  
2013. Nature**

Pottery vessel  
Lipids analysis



Critical step in making milk  
less perishable, and more  
digestible for  
early prehistoric farmers

- 8000 years **nature**

Des traces de lipides laitiers montrent que ces poteries ont servie à égoutter du lait....  
Rendre le lait moins périssable et plus digeste.....

# Qui débute avec la domestication d'animaux source de lait - néolithique, 5000 avant JC

## First dairying in green Saharan Africa in the fifth millennium bc

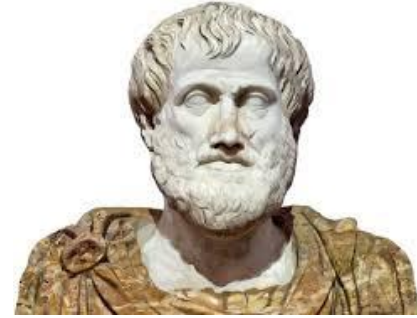
J Dunne et al. Nature **486**, 390-394 (2012) doi:10.1038/nature11186



nature

Représentation ancienne d'élevage, de traite de ruminants et de manipulation du lait.....

# Aristote (384 BC –322 BC)



**Kykeon** (Gr. κυκεών, de κυκάω, mixer), une vieille recette grecque de vin et de fromage

Aux pouvoirs magiques !



# Pline l'ancien, AD 23–79)

## «Histoire naturelle, chapitre XI «De diversitate caseorum»»



Décrit un fromage de brebis des Babales (Lozère, France)



Et un fromage de vache des Arverni (Auvergne, France)

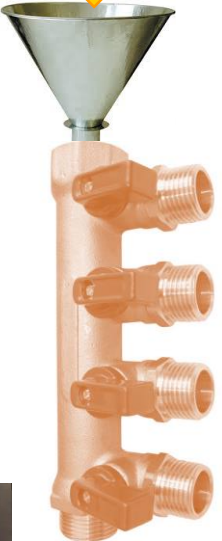
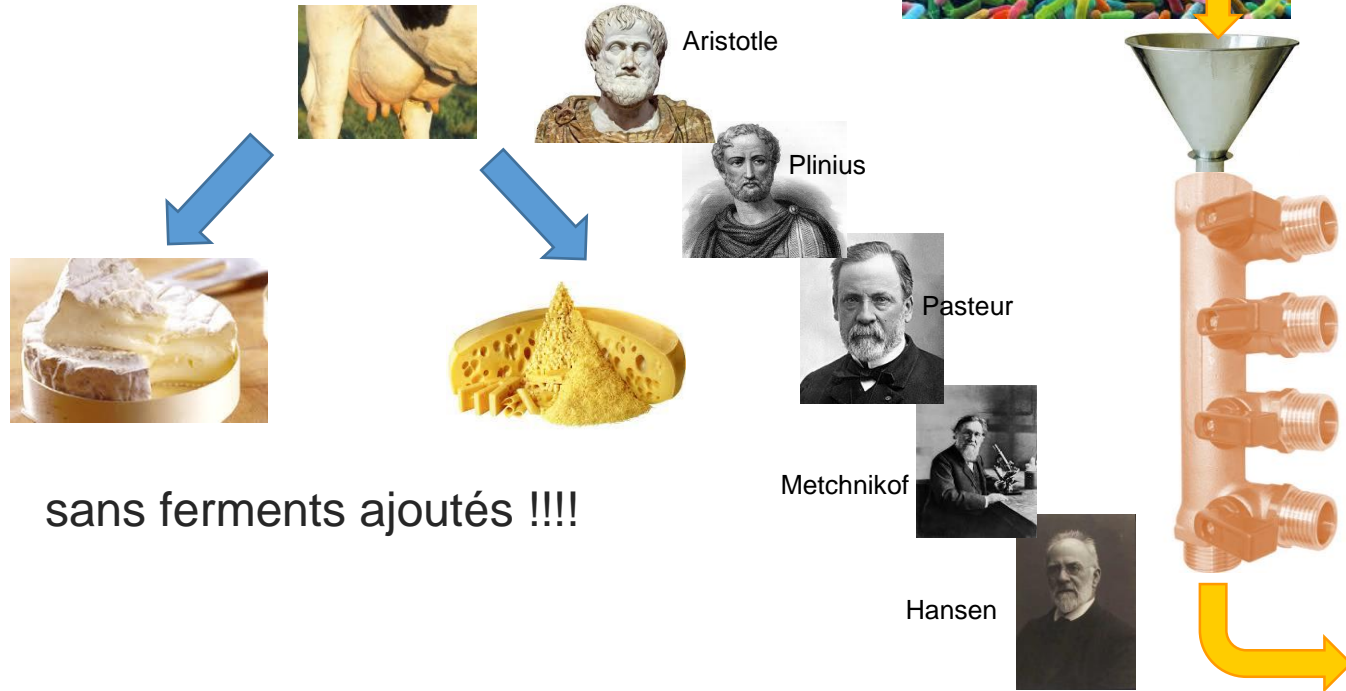


Tous ces fromages sans ferments ajoutés !!!!



# L'itinéraire technologique sélectionne les bactéries

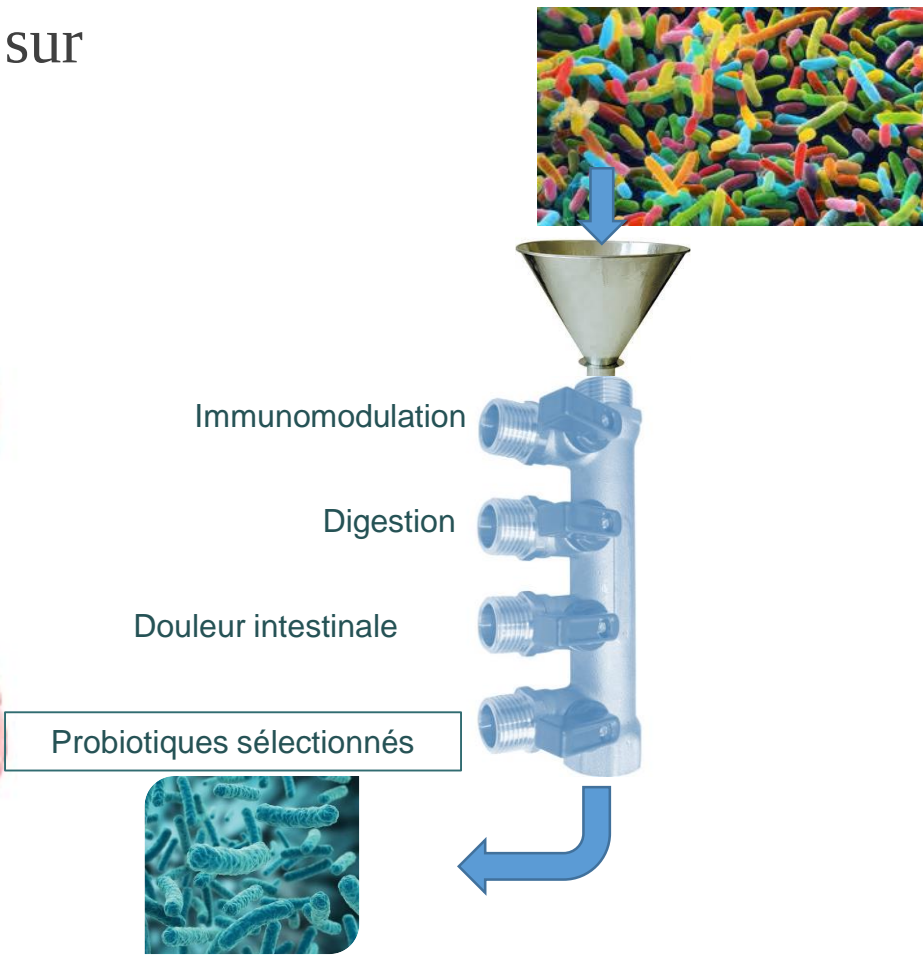
De nos jours, l'industrie sélectionne les bactéries

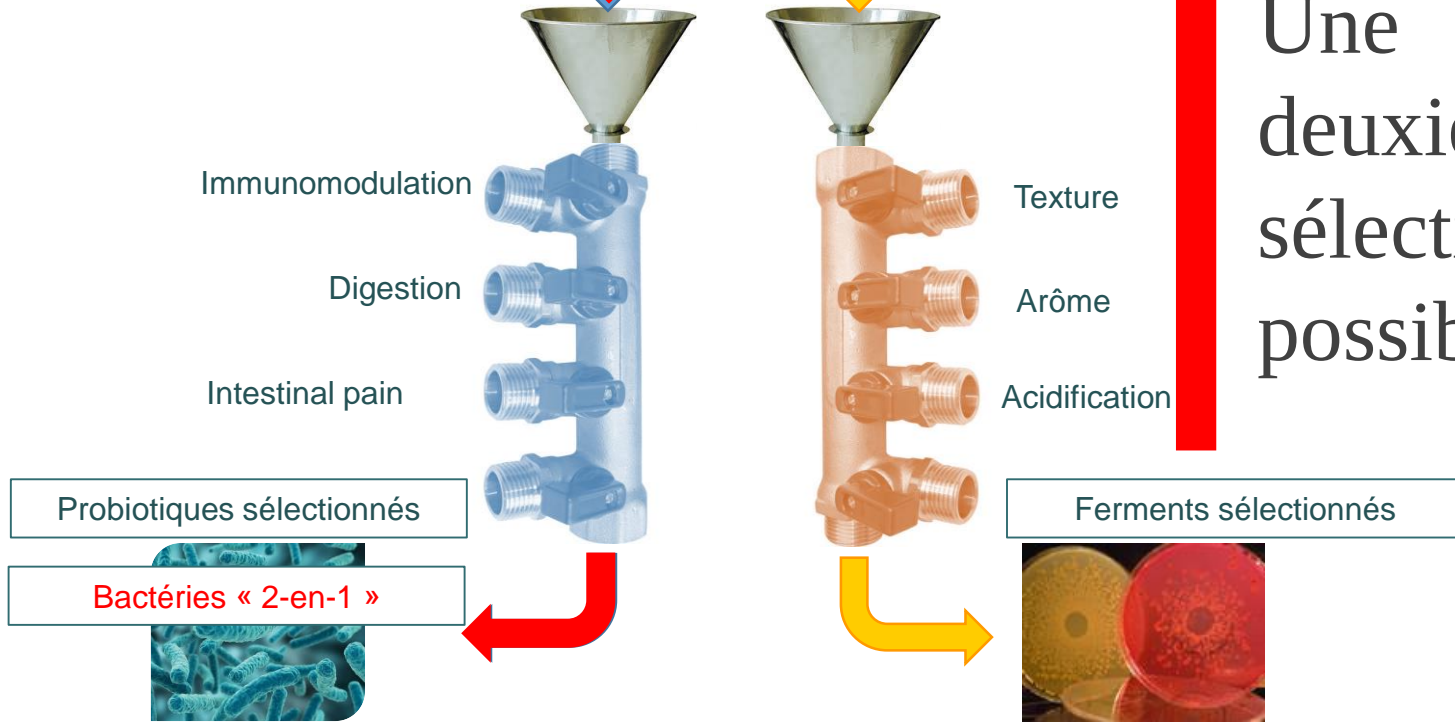


sans ferments ajoutés !!!!

# D'autres bactéries sont sélectionnées sur d'autres critères

IBS, IBD, atonie, intolérance ...





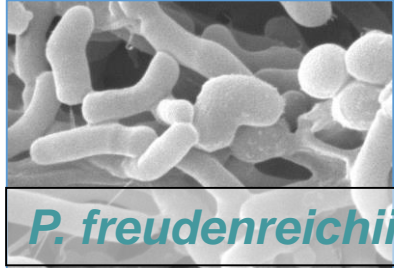
Une deuxième sélection est possible



# L'Emmental et les propionibactéries ...



# Les propionibactéries, des actinobactéries

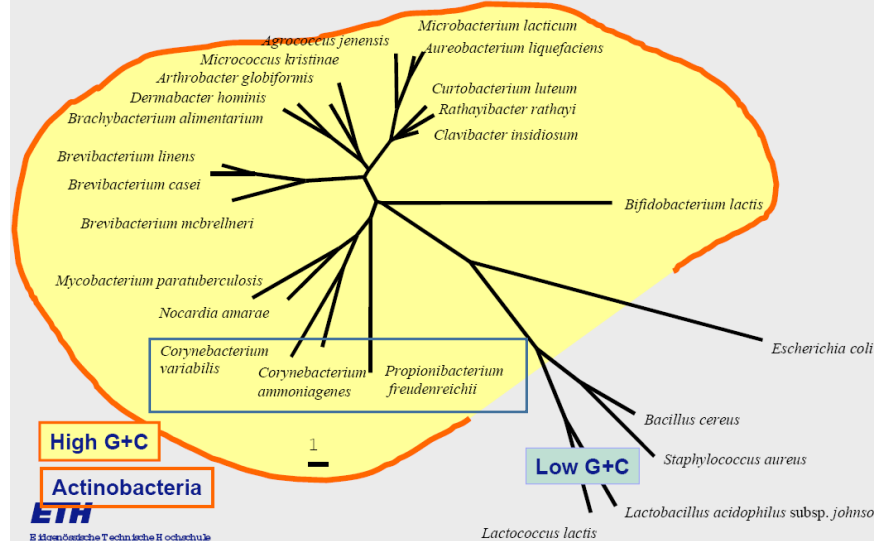


Gram +  
pleiomorphic

anaerobic to microaérophilic  
non motiles et non sporulated

GC Rich : 67%

Phylogenetic tree of the class *Actinobacteria* based on 16S rDNA



« Dairy » :

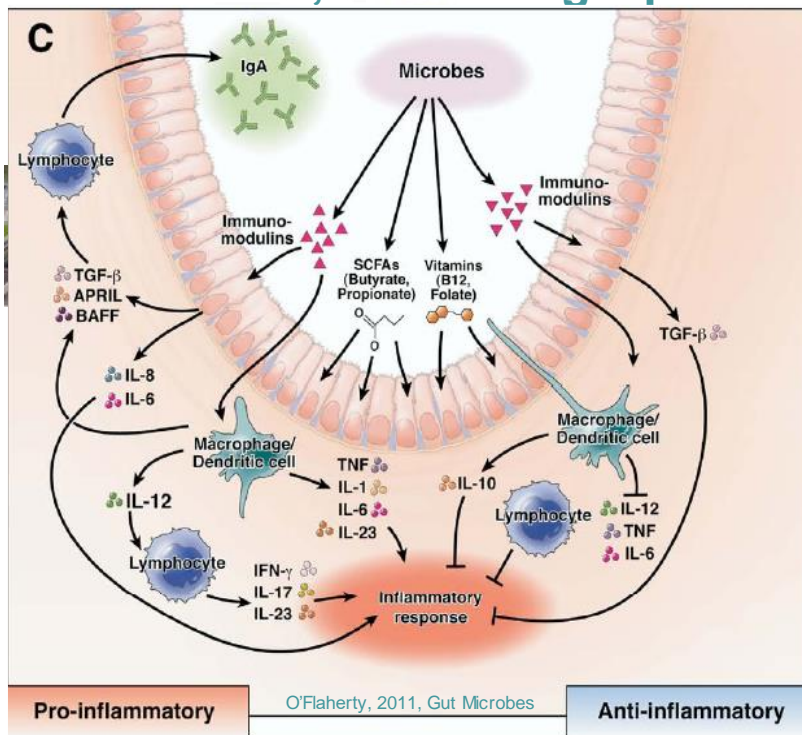
*P. freudenreichii*

*P. jensenii* - *P. thoenii* - *P. acidipropionici*

# Les propionibactéries, des couteaux suisses?



## Propionibactéries, une écologie particulière



→ Vitamines B9, B12



→ Probiotiques



→ Bio contrôle



→ Ferment d'affinage



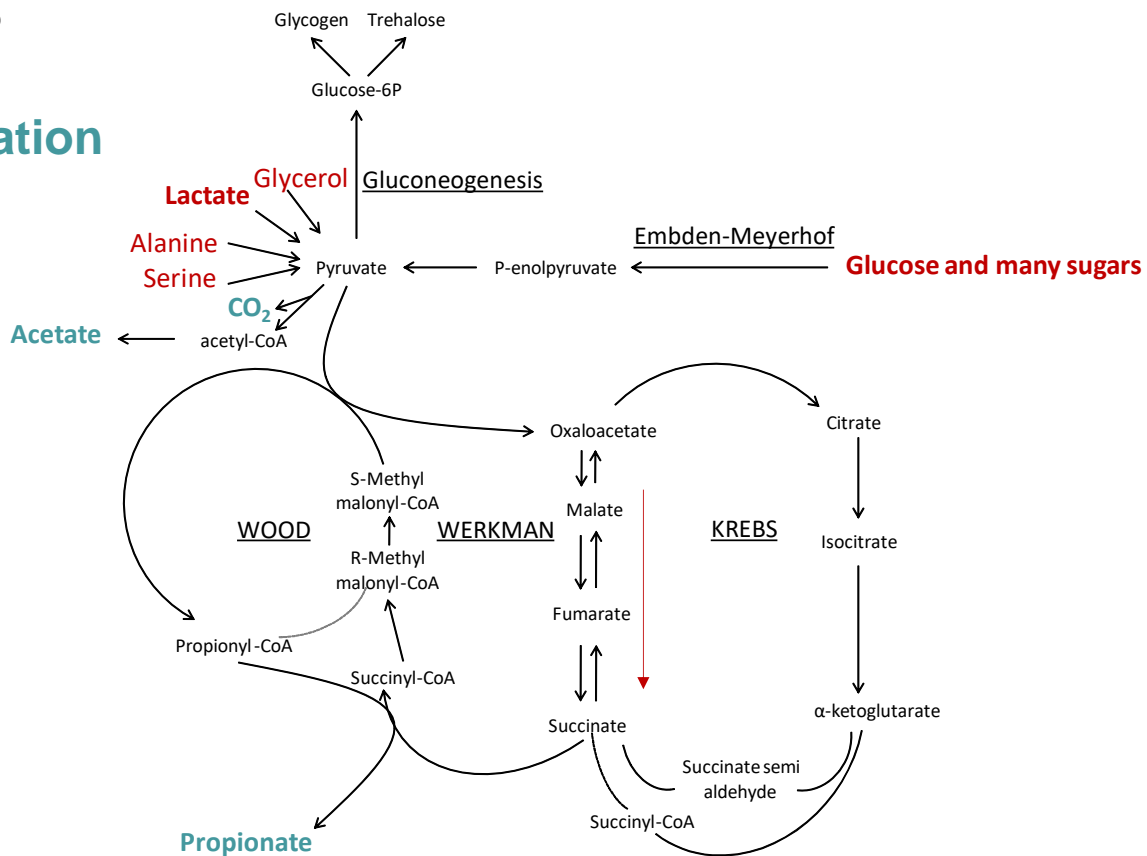
AGCC

Effets connus sur l'apoptose



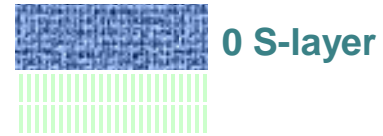
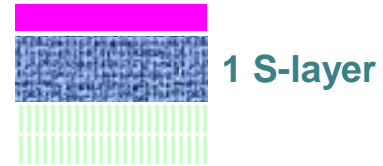
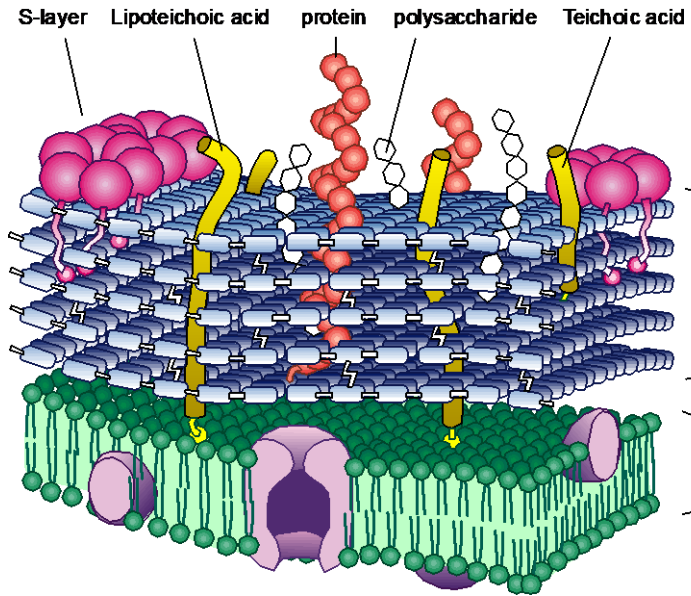
# Les propionibactéries

## Propionibactéries, une fermentation particulière



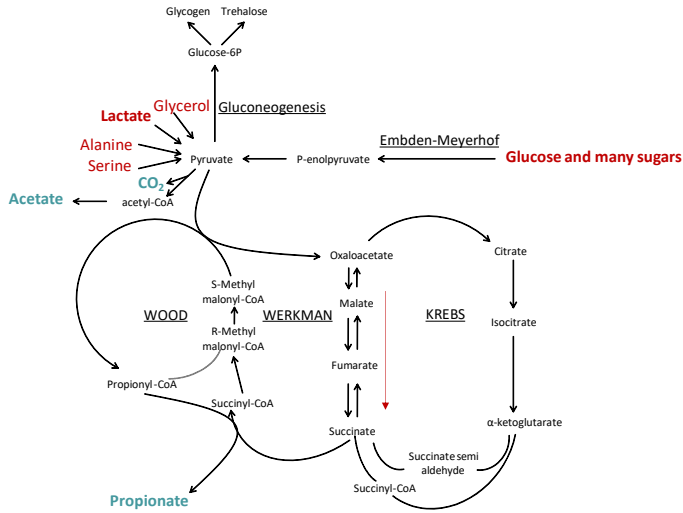


# Propionibactéries, une surface variable !





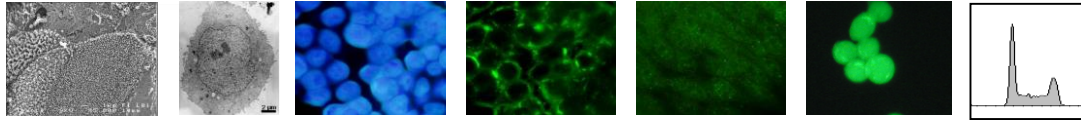
# Les propionibactéries et le cancer ...



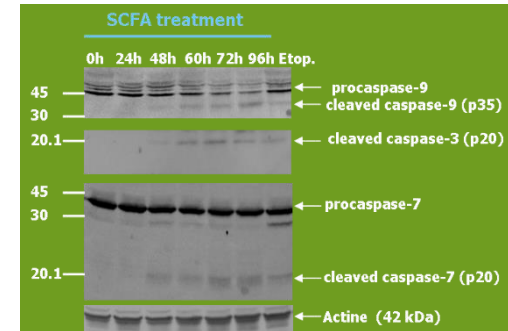
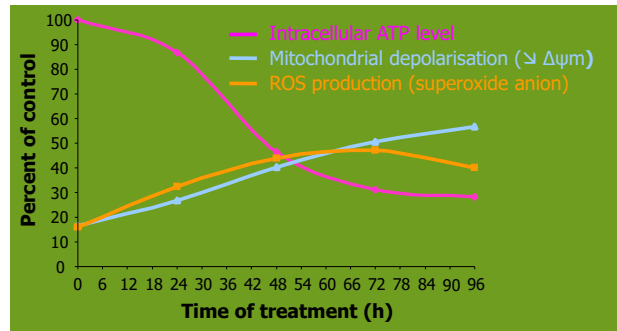
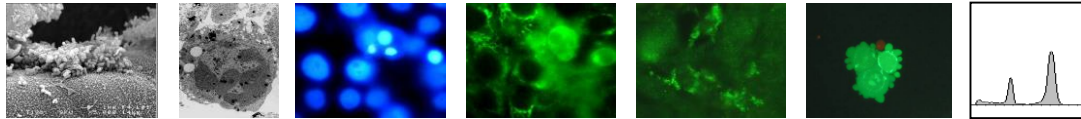
# Tue les cellules cancéreuses en culture

Par apoptose

→ Caco2



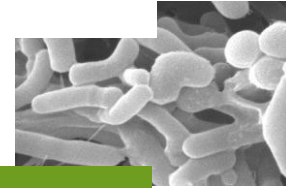
→ Co-culture



# Tue les cellules cancéreuses en culture

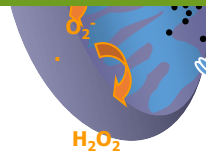
Par apoptose

SCFA



OK, mais avec un produit laitier?

Reactive  
Oxygen  
Species



H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Nucleus

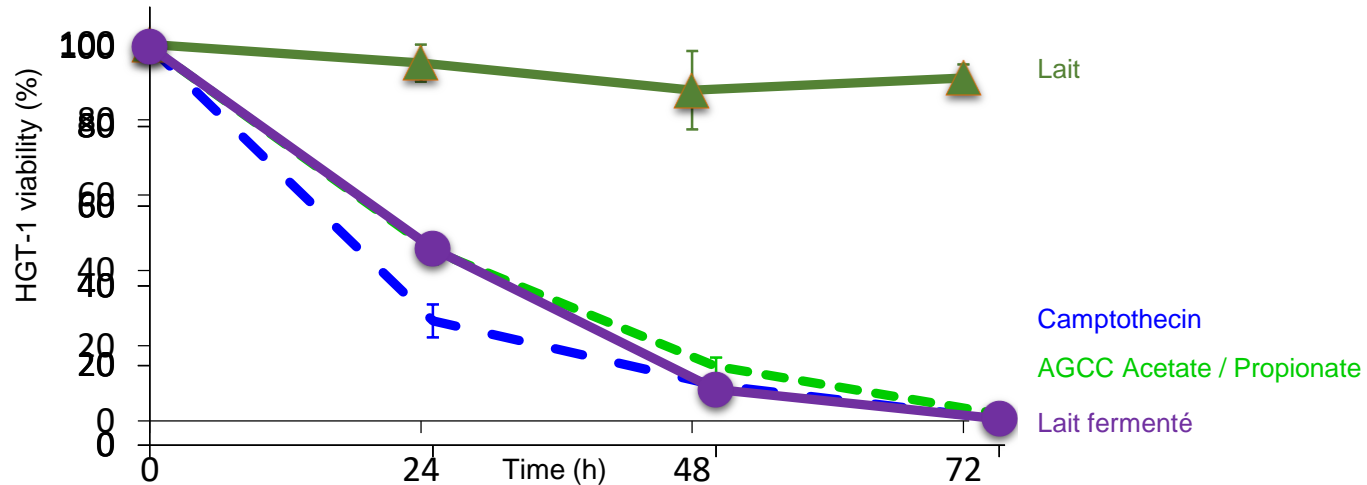
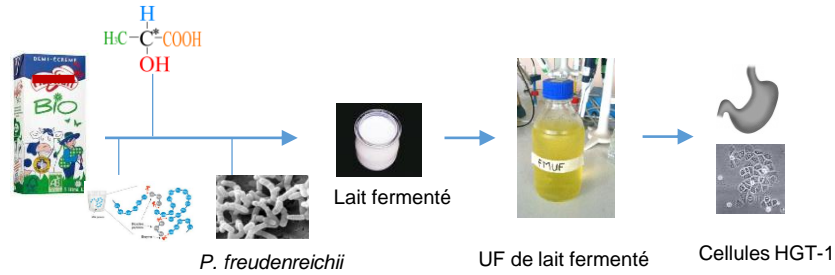
Caspase 9

Caspase 3 / 7

DNA  
Condensation &  
Fragmentation  
Cell cycle arrest

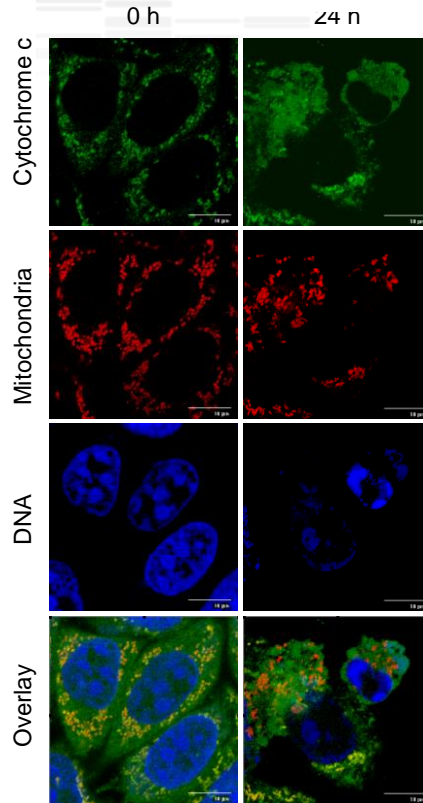
# Un nouveau lait fermenté

Effet sur cellules cancéreuses



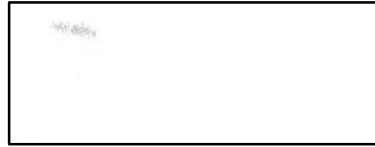
# Un nouveau lait fermenté

## Effet sur cellules cancéreuses



### Western Blot /cytoplasm

0 h



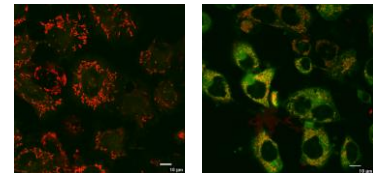
Cytochrome c



Hsc 70

↪ **Fuite du  
Cytochrome c**

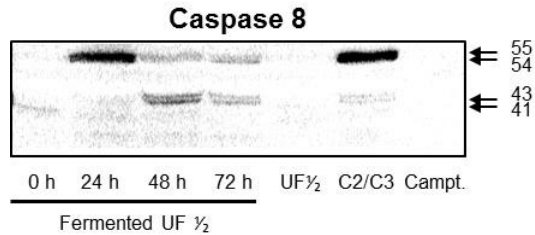
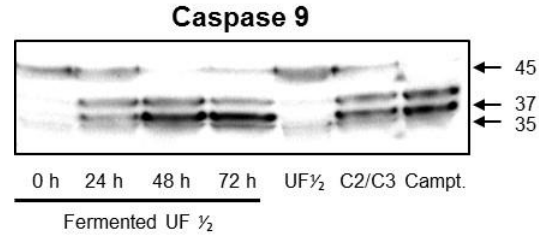
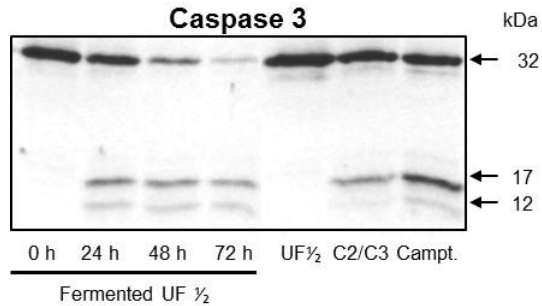
Control-JC1      UF fermenté ½ (24 h)



↪ **Dépolarisation des  
mitochondries**

# Un nouveau lait fermenté

Effet sur cellules cancéreuses : caspases



⇒ **Activation des caspases**



# Un nouveau lait fermenté

Effet sur cellules cancéreuses : synergie avec chimiothérapie

45



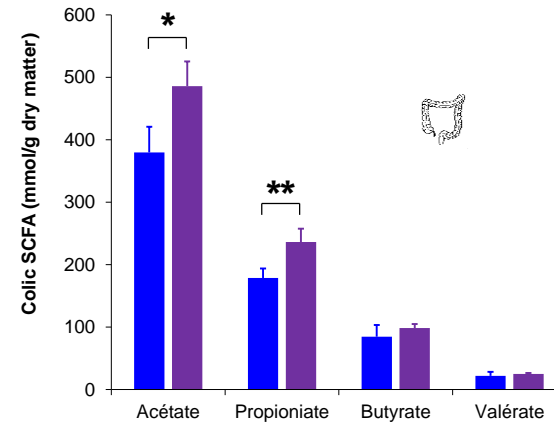
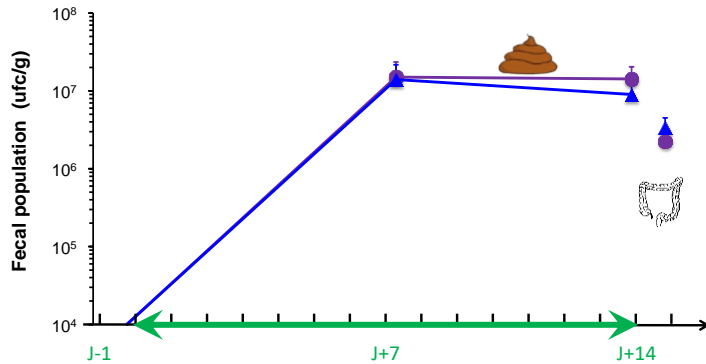
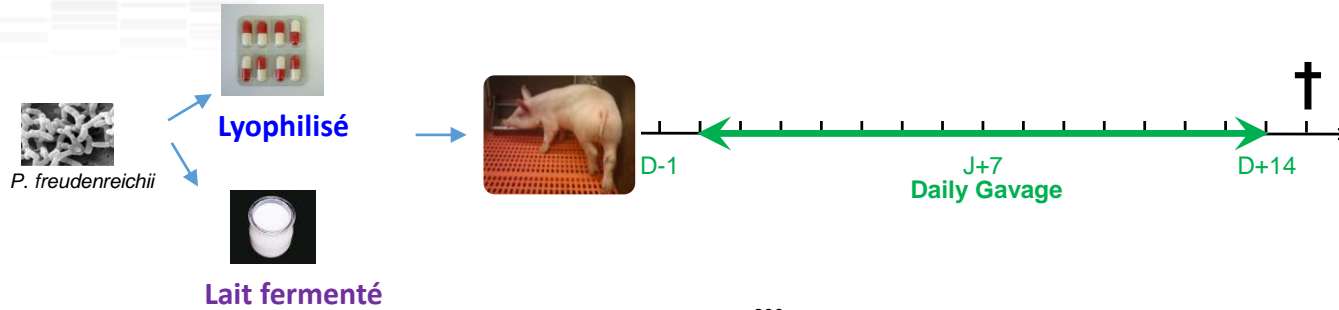
OK, mais les  
propionibactéries  
arrivent-elles au colon  
vivantes?

↪ Un effet additif

↪ Effets similaires sur HT-29

# Un nouveau lait fermenté

Promeut l'activité métabolique *in vivo*



👉 Cela dépend du vecteur d'apport alimentaire

# Un nouveau lait fermenté

Avec un impact sur la physiologie *in vivo*



■ Lait

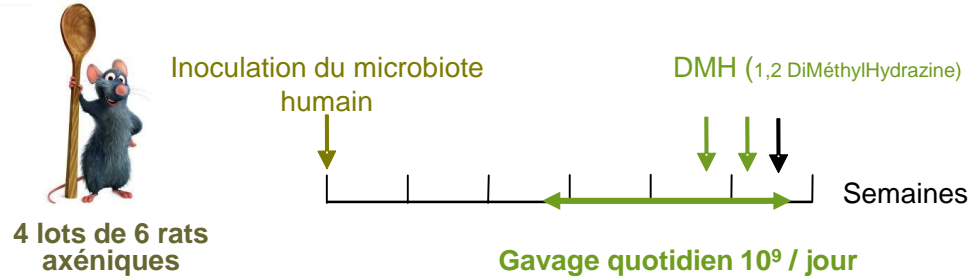
■ Lait fermenté

OK, mais quel est l'impact des  
métabolites propionibactériens  
sur la carcinogenèse *in vivo*?

↪ Effets sur la physiologie  
digestive

# Rats à microbiote humain (HMA)

Avec carcinogénèse induite : Diméthylhydrazine (DMH)

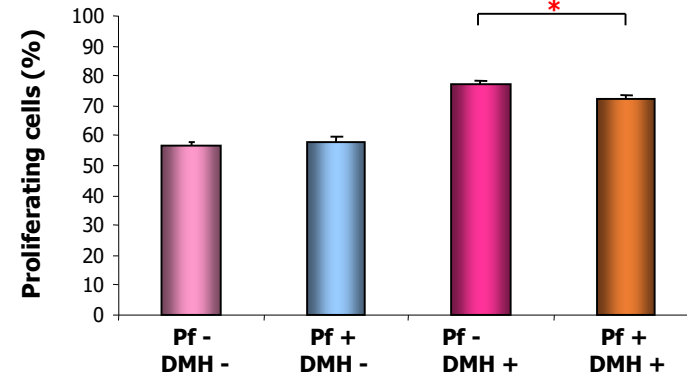
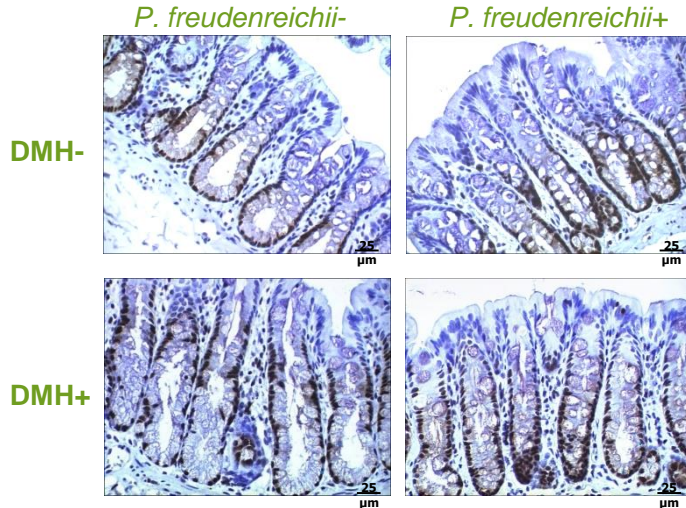


Apoptose : TUNEL

Prolifération : PCNA

# Rats à microbiote humain (HMA)

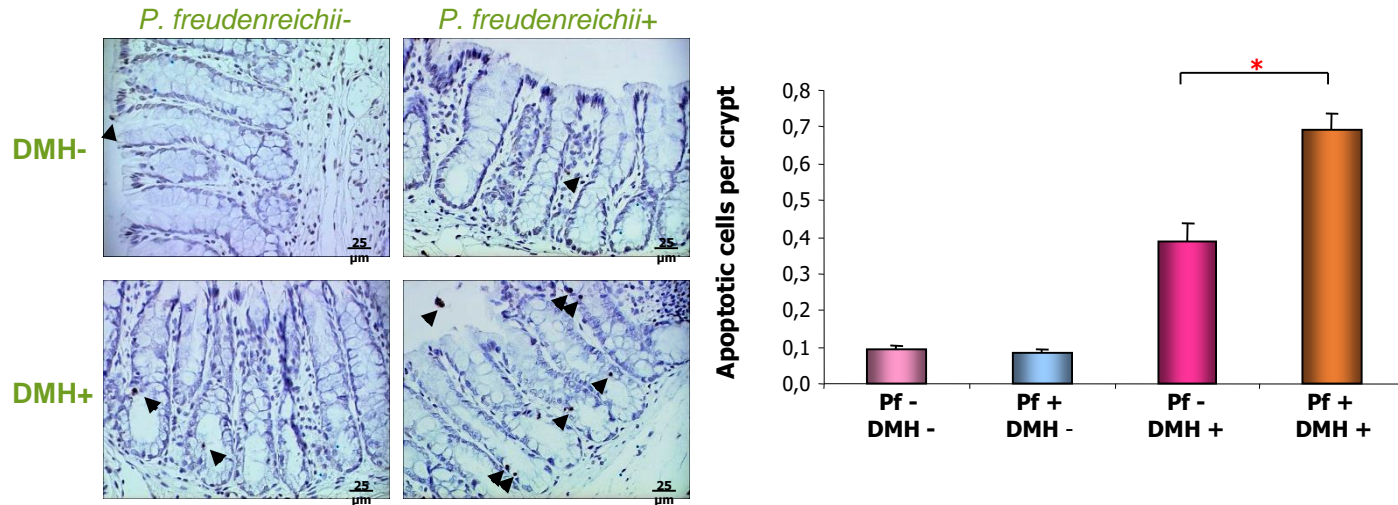
PCNA : prolifération



- Pas d'effet de *P. freudenreichii* sur la prolifération chez les rats contrôles
- Peu d'effet de *P. freudenreichii* sur la prolifération chez les rats mutagénisés

# Rats à microbiote humain (HMA)

TUNEL : apoptose



- Pas d'effet de *P. freudenreichii* sur l'apoptose chez les rats contrôles
- *P. freudenreichii* augmente l'apoptose chez les rats mutagénisés

# CONCLUSION

- ❖ Un produit laitier fermenté par *Propionibacterium freudenreichii* induit l'apoptose *in vitro*.
- ❖ Un produit laitier fermenté par *Propionibacterium freudenreichii* apporte des propionibactéries vivantes au côlon.
- ❖ *Propionibacterium freudenreichii* , ingéré, favorise l'élimination apoptotique de colonocytes endommagés dans le contexte de la carcinogénèse



?

Fabrice Pierre

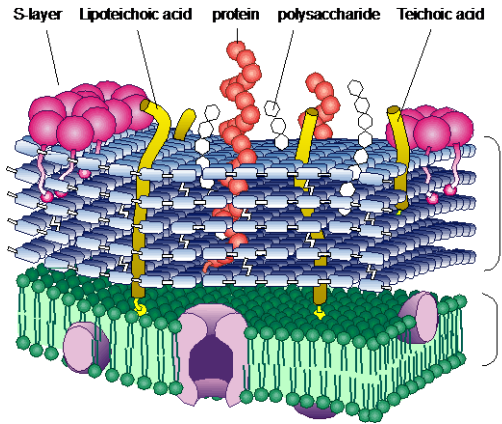
↪ **Un aliment fonctionnel pour prévenir les effets carcinogènes des viandes rouges ?**







# Les propionibactéries et l'inflammation ...



# Propionibactéries anti-inflammatoires?

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Dec. 2010, p. 8259–8264  
 0099-2216/10/\$12.00 doi:10.1128/AEM.01975-10  
 Copyright © 2010, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 76, No. 24

## Promising Immunomodulatory Effects of Selected Strains of Dairy Propionibacteria as Evidenced *In Vitro* and *In Vivo*<sup>†‡</sup>

Benoit Foligné,<sup>1,2,3,4</sup> Stéphanie-Marie Deutsch,<sup>5,6</sup> Jérôme Breton,<sup>1,2,3,4</sup> Fabien J. Cousin,<sup>5,6,7</sup> Joëlle Dewulf,<sup>1,2,3,4</sup> Michel Samson,<sup>8</sup> Bruno Pot,<sup>1,2,3,4</sup> and Gwénaél Jan<sup>1,2,3,4</sup>

*Institut Pasteur de Lille, Lactic Acid Bacteria & Mucosal Immunity, Center for Infection and Immunity of Lille, 1, Rue du Pr Calmette, BP 245, F-59019 Lille, France<sup>1</sup>; Université Lille Nord de France, F-59000 Lille, France<sup>2</sup>; CNRS UMR 8204, F-59021 Lille, France<sup>3</sup>; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1019, F-59019 Lille, France<sup>4</sup>; INRA, UMR1253 Science et Technologie du Lait et de l'Oeuf, F-35042 Rennes, France<sup>5</sup>; AGROCAMPUS OUEST, UMR1253 Science et Technologie du Lait et de l'Oeuf, F-35042 Rennes, France<sup>6</sup>; CNIEL Synthelabs, 42 Rue de Châteauneuf, F-75314 Paris 09, France<sup>7</sup>; and EA 4427 SeRAIC, Faculty of Pharmacy, University of Rennes 1, IFR 140 GFAS, Rennes F-35043, France<sup>8</sup>*

Received 20 August 2010/Accepted 7 October 2010

Immunomodulatory properties of 10 dairy propionibacteria, analyzed on human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), revealed a highly strain-dependent induction of anti-inflammatory cytokine interleukin 10 (IL-10). Two selected strains of *Propionibacterium freudenreichii* showed a protective effect against two models of colitis in mice, suggesting a probiotic potential predicted by immune-based selection criteria for these cheese starter bacteria.

Selected probiotics



Lille Inflammation Research International Center

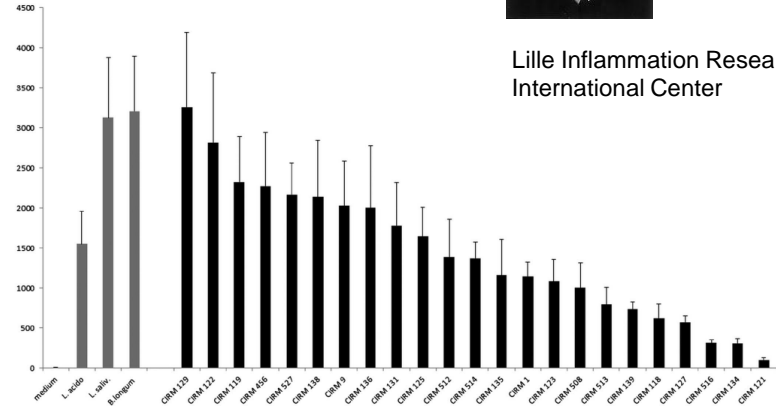


Figure 1 Anti-inflammatory profile of dairy *Propionibacterium freudenreichii* strains assessed on human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Comparative IL-10 release (in pg/ml) of human PBMCs for 3 reference benchmark probiotic strains (*Lactobacillus acidophilus* NCFM, *L. salivarius* LS33 and *Bifidobacterium longum* BB536) and for 23 propionibacteria strains (CIRM-BIA, INRA, Rennes, France). Immunocompetent cells were stimulated at multiplicity of infection of 10 for 24 h and supernatants analysed by ELISA. Detailed methodology was previously published.<sup>†</sup>



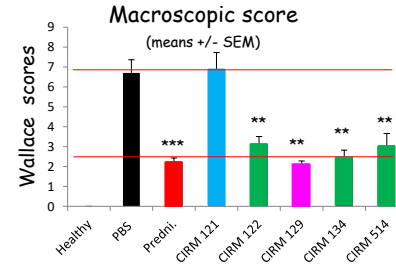
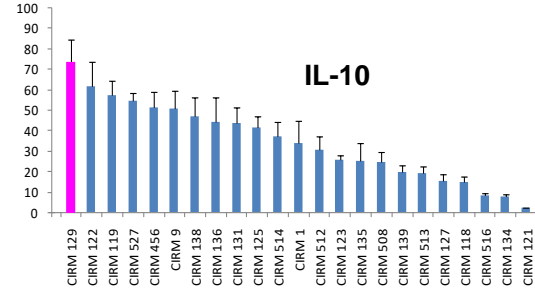
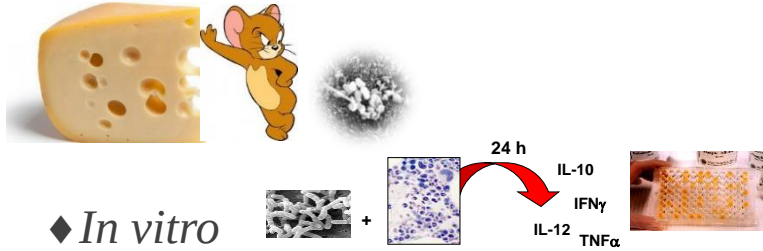
## Tracking the microbiome functionality: focus on *Propionibacterium* species

Benoit Foligné, Jérôme Breton, Denis Mater, et al.

*Gut* 2013 62: 1227–1228 originally published online February 6, 2013  
 doi: 10.1136/gutjnl-2012-304393

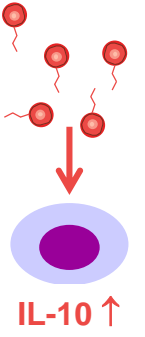
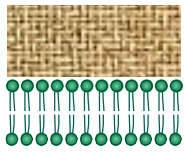
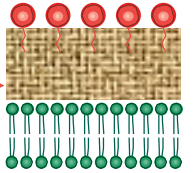
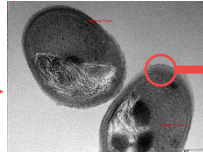
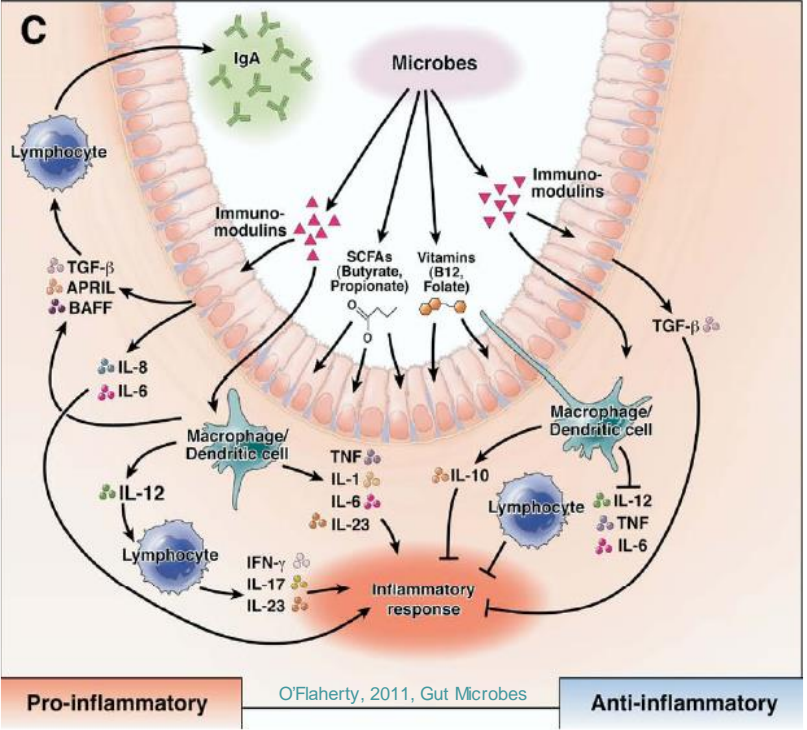
➤ Des souches prometteuses

# L'ANR SURFING en quelques mots



**SURFING**  
Starter Surface  
against Inflammation of the Gut

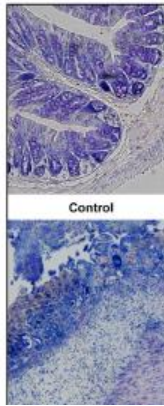
# L'ANR SURFING en quelques mots



Inflammation

**SURFING**  
Starter Surface  
against Inflammation of the Gut

# Bactéries propioniques et lactiques



APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Dec. 2010, p. 8259–8264  
 0099-2240/10/\$12.00 doi:10.1128/AEM.01976-10  
 Copyright © 2010, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 76, No. 24

## Promising Immunomodulatory Effects of Selected Strains of Dairy Propionibacteria as Evidenced *In Vitro* and *In Vivo*<sup>†</sup>

Benoît Folligné,<sup>1,2,3,4</sup> Stéphanie-Marie Deutsch,<sup>5,6</sup> Jérôme Breton,<sup>1,2,3,4</sup> Fabien J. Cousin,<sup>5,6,7</sup>  
 Joëlle Dewulf,<sup>1,2,3,4</sup> Michel Samson,<sup>8</sup>



Let's make probiotic cheese!!!

SURFING

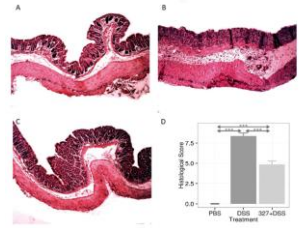
Starter Surface  
against Inflammation of the Gut

OPEN ACCESS Freely available online



## Local and Systemic Immune Mechanisms Underlying the Anti-Colitis Effects of the Dairy Bacterium *Lactobacillus delbrueckii*

Clarissa Santos Rocha<sup>1,3,4</sup>, Ana Cristina Gomes-Santos<sup>2</sup>, Thais Garcias Moreira<sup>2</sup>, Marcela de Azevedo<sup>1</sup>,  
 Tessalia Diniz Luerce<sup>1</sup>, Mahendra Mariadassou<sup>5</sup>, Ana Paula Longaray Delamare<sup>6</sup>, Philippe Langella<sup>3,4</sup>,  
 Emmanuelle Maguin<sup>3,4</sup>, Vasco Azevedo<sup>1</sup>, Ana Maria Caetano de Faria<sup>2</sup>, Anderson Miyoshi<sup>1</sup>,  
 Maarten van de Guchte<sup>3,4,5</sup>



# Un fromage par ingénierie réverse



Microfiltr. Milk

Powder 100 g/L

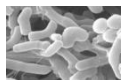


Cream 150 g/L



Sterilisation

Culture *P. freudenreichii*  
30°C, 72 h



Pre-cheese

UHT Milk



Culture *L. delbrueckii*  
42°C, 4 h



Fermented Milk

Clotting, stirring, cooking,  
moulding, pressing,  
wrapping, ripening



Mol. Nutr. Food Res. 2016, 60, 935–948

DOI 10.1002/mnfr.201500580

935

RESEARCH ARTICLE

Molecular Nutrition  
Food Research

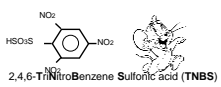
## Combining selected immunomodulatory *Propionibacterium freudenreichii* and *Lactobacillus delbrueckii* strains: Reverse engineering development of an anti-inflammatory cheese

Coline Plé<sup>1</sup>, Jérôme Breton<sup>1</sup>, Romain Richoux<sup>2</sup>, Marine Nurdin<sup>2</sup>, Stéphanie-Marie Deutsch<sup>3,4</sup>,  
Hélène Falentin<sup>3,4</sup>, Christophe Hervé<sup>5</sup>, Victoria Chuat<sup>3,4,6</sup>, Riwanon Lemée<sup>5</sup>,  
Emmanuelle Maguin<sup>7,8</sup>, Gwénaél Jan<sup>3,4</sup>, Maarten Van de Guchte<sup>7,8</sup> and Benoit Foligné<sup>1</sup>





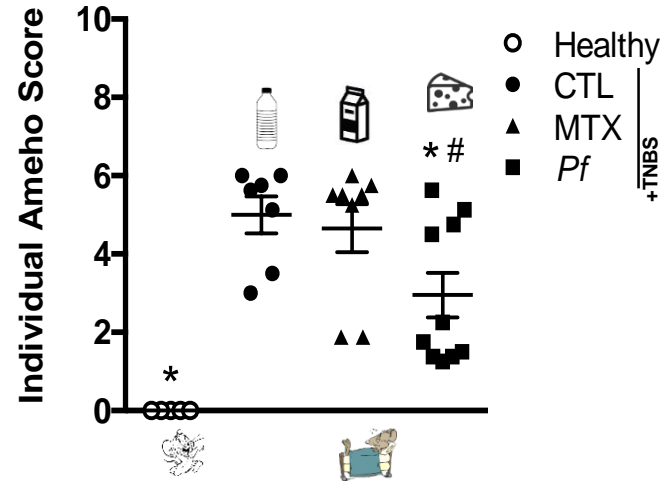
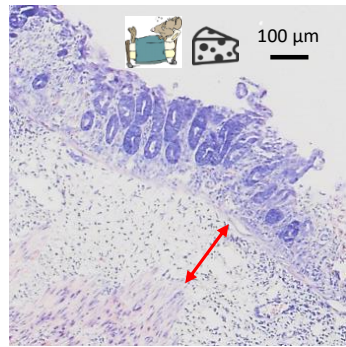
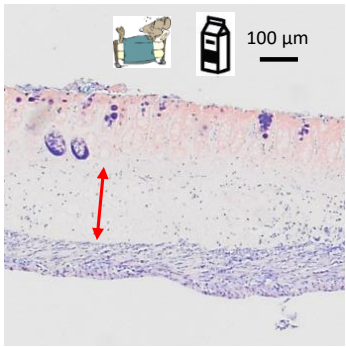
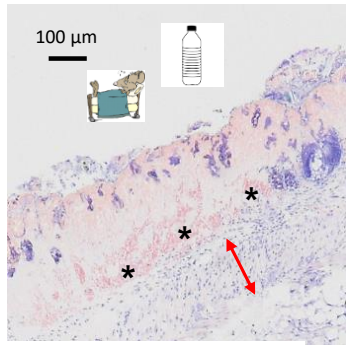
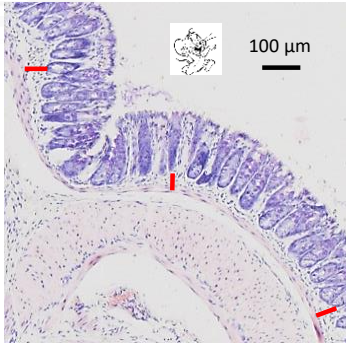
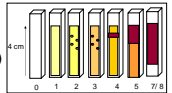
# Le fromage protège



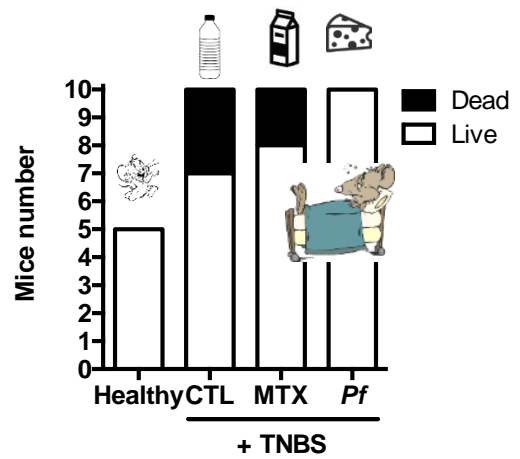
Acute colitis



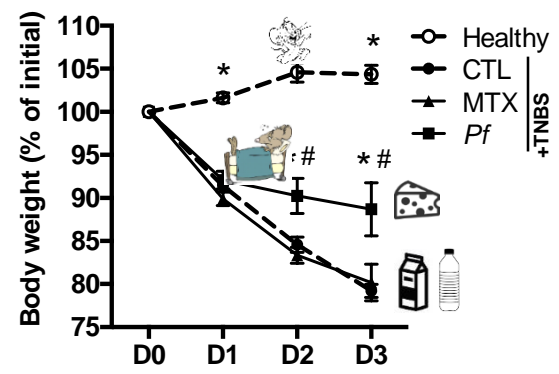
Macroscopic score (Wallace)



# Le fromage protège



Survival

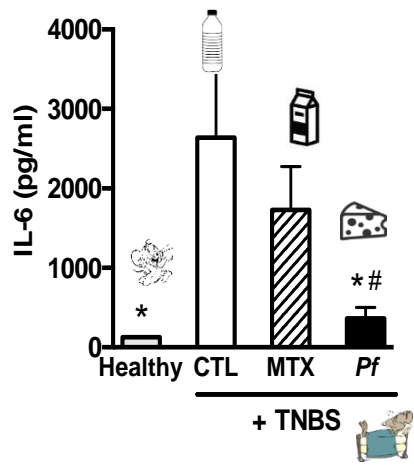


Body weight

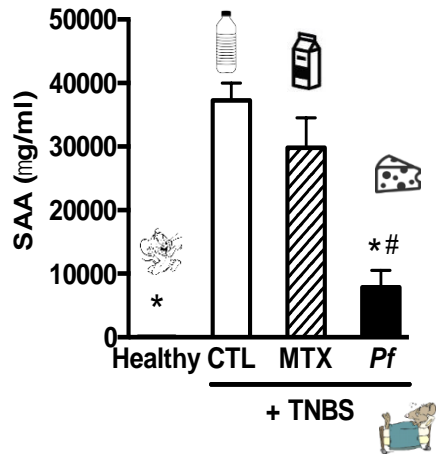


# Le fromage protège

## Blood inflammation markers



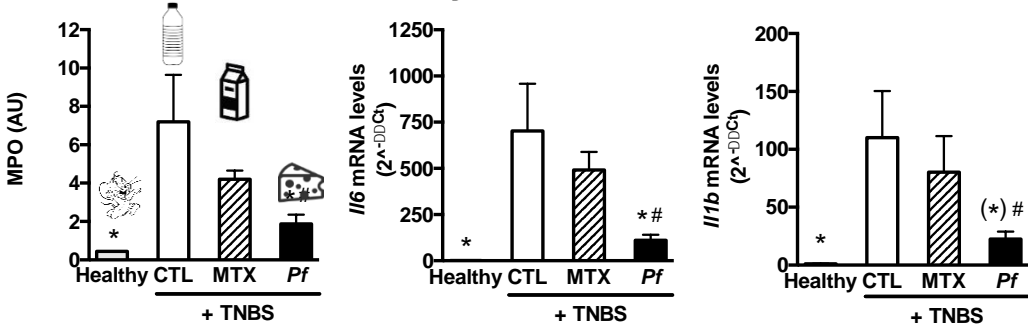
Interleukin 6



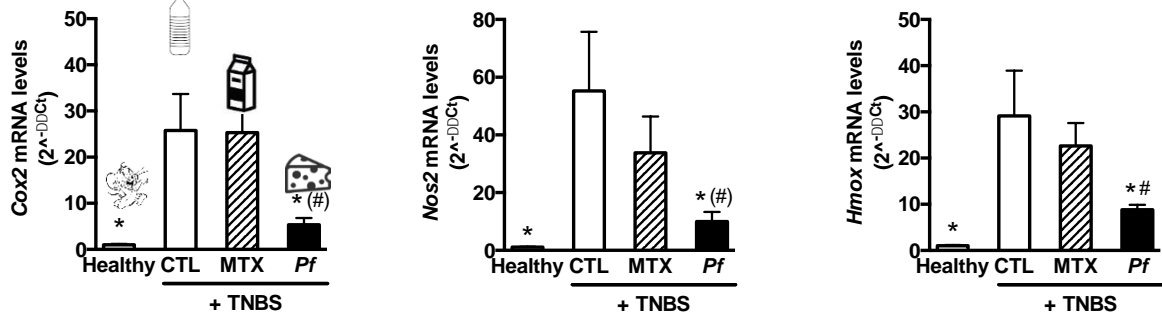
Serum Amyloid A

# Le fromage protège

## Colonic inflammatory markers



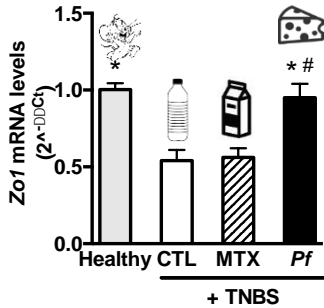
## Colonic oxidative stress markers



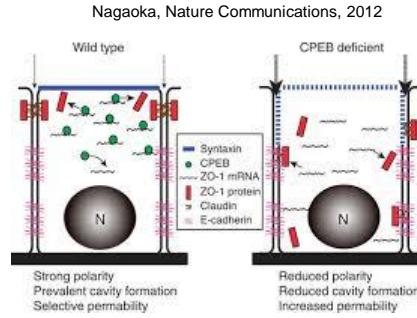
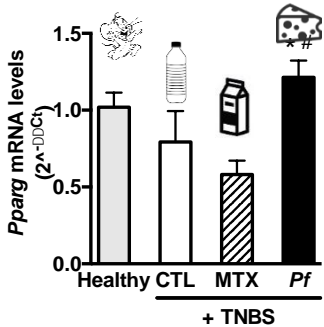
\* p<0.05: vs CTL  
# p<0.05: vs MTX

# Le fromage protège

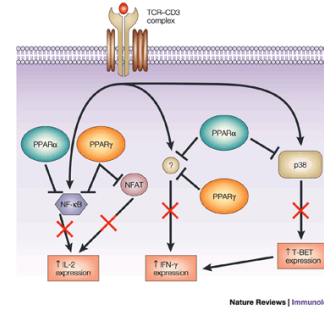
## Colonic epithelial cell markers



\* p<0.05: vs CTL  
# p<0.05: vs MTX



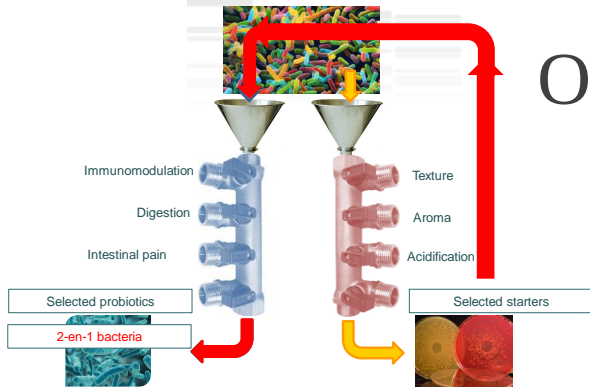
The zona occludens proteins (ZO-1, ZO-2 and ZO-3) : tight junction proteins that function as cross-linkers



Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) regulate T-cell cytokine production.

# Mais c'est toujours un fromage de labo

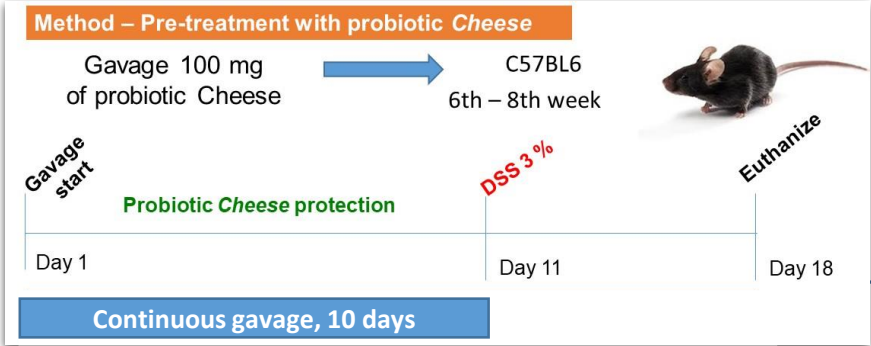
## On veut de l'Emmental



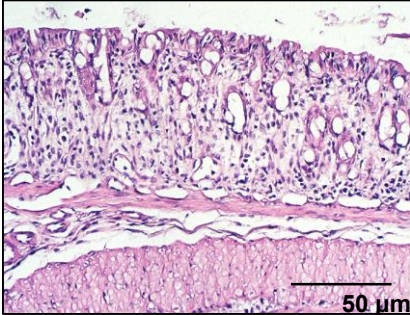
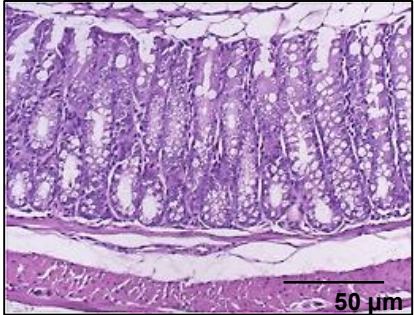
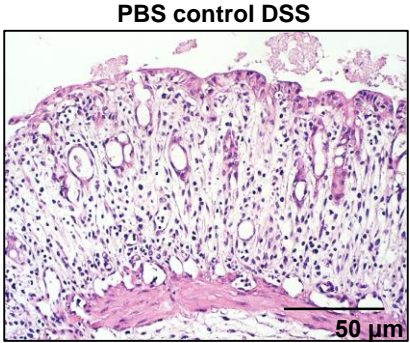
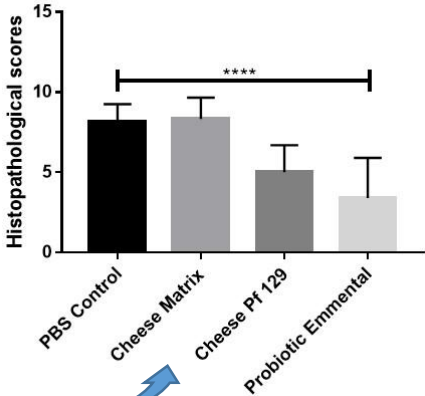
*Propionibacterium freudenreichii*  
*Streptococcus thermophilus*  
*Lactobacillus delbrueckii*



# Cet Emmental protège (pas tous les fromages)



Probiotic Emmental x Colitis



Noninflamed control

Probiotic Emmental

# Un lait fermenté pour la mucite (mucositis)

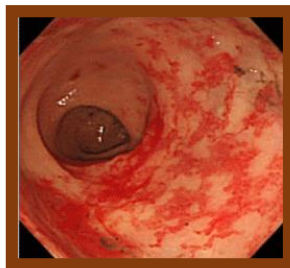
**IBD**

- GIT Chronic inflammation

**Ulcerative  
Colitis**



**Mucositis**



**GI Mucositis**



**Oral mucositis**

**5-Fluoracil (5-FU)**

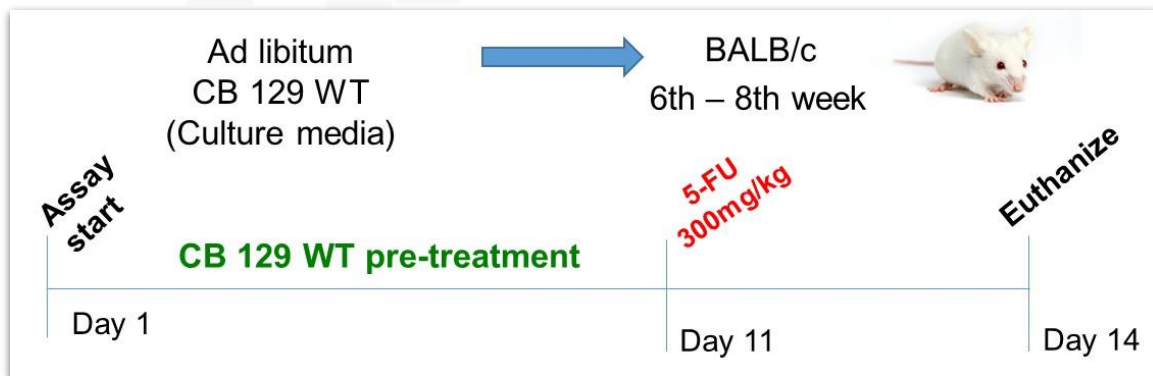
- Head, neck and colon cancer.

(Chang *et al.*, 2012; Falvey *et al.*, 2015)

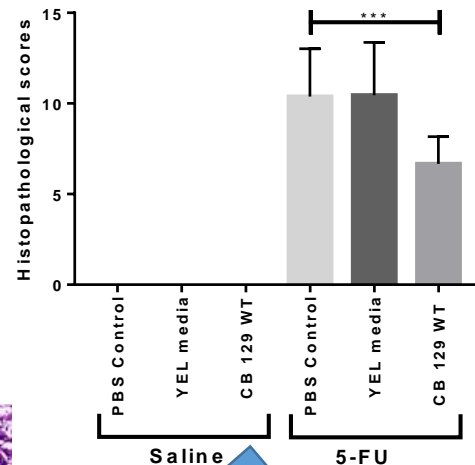




# *P. freudenreichii* ameliorates mucositis in mouse model (5-FU)



*P. freudenreichii* CB 129 x Mucositis



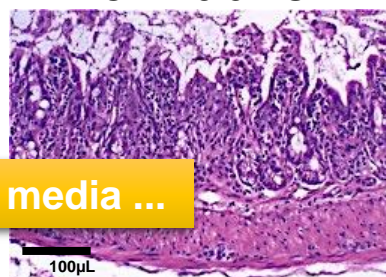
Healthy Ileum



Inflamed Ileum- 5-FU



*P. f* CB129 5-FU



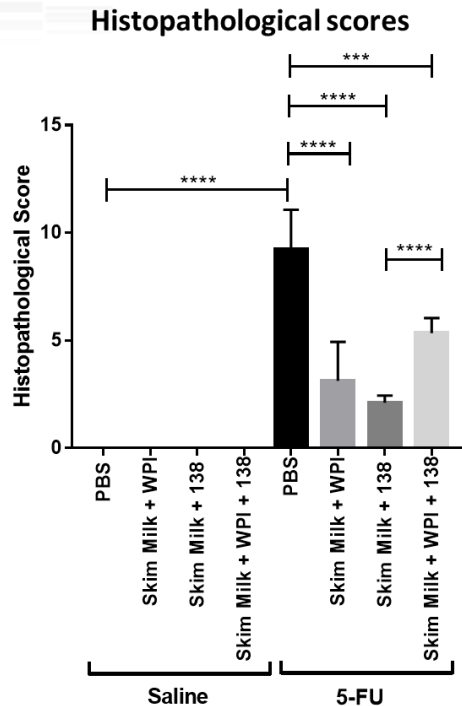
However, nobody drinks culture media ...

MAKE A PROBIOTIC BEVERAGE!!!

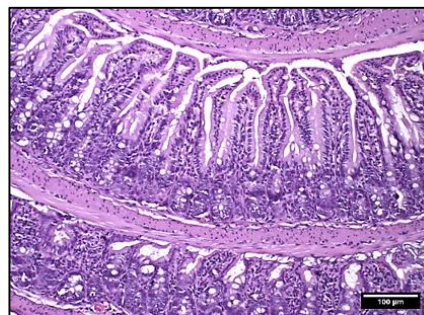
# *P. freudenreichii* ameliorates mucositis in mouse model (5-FU)



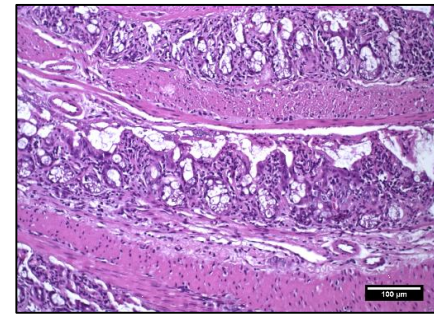
Fermented Milk by *P. freudenreichii* 138 supplemented with Whey Protein Isolate (WPI).



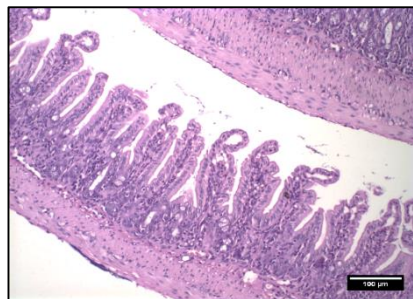
## Representative images from mucosal histopathology (H&E)



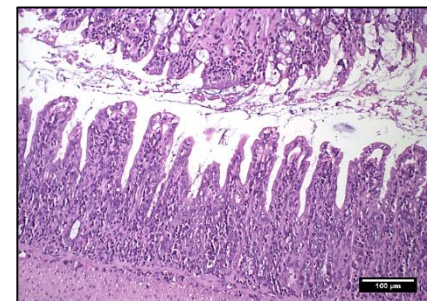
Healthy Ileum



PBS + 5-FU



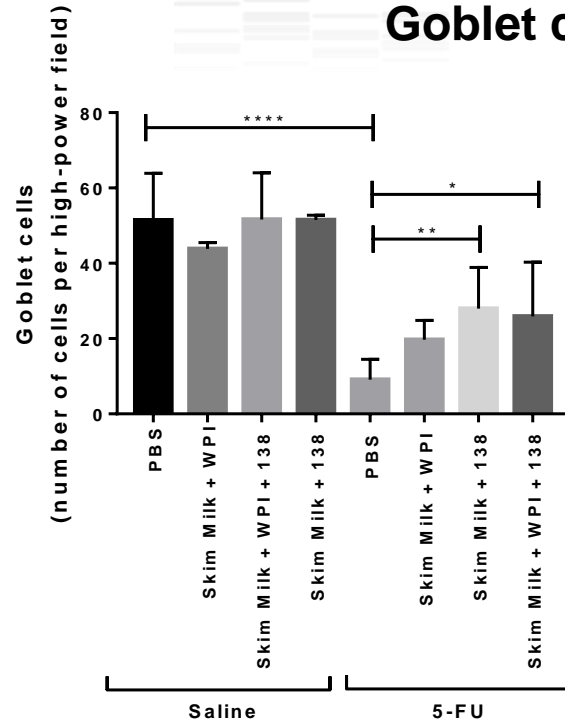
LDF + 138 + 5-FU



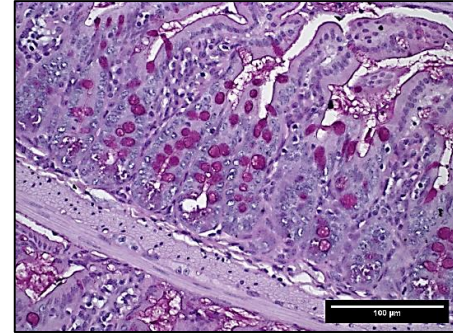
LDFWPI + 138 + 5-FU



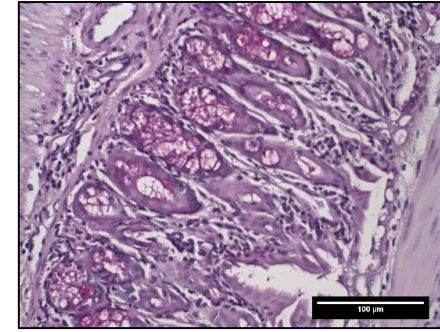
# *P. freudenreichii* ameliorate mucositis in mouse model (5-FU)



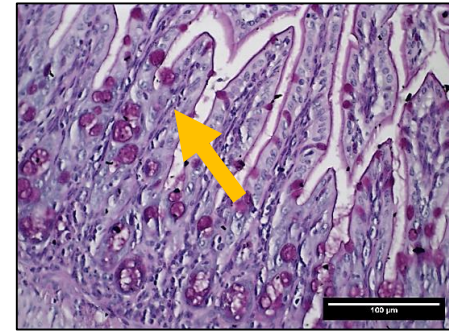
Representative images of stained goblet cells (PAS)



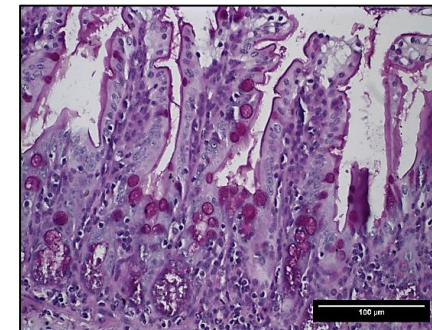
Healthy Ileum



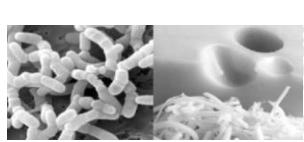
PBS + 5FU



LDF + 138 + 5FU



LDFWPI + 138 + 5FU



## Conclusion:



- √ Aliments fermentés : une source de bactéries probiotiques, mais pas que ...
- √ Des souches, des molécules et des mécanismes en cours d'étude

## Perspectives :

- √ Etudes précliniques et cliniques sur des produits fermentés
- √ Produits fermentés pour populations cibles



Fermented foods : 30% of our diet

A major source of bacteria : 10<sup>10</sup> per day!

A huge variety of bacteria



IMPACT



Thank you for your attention

Don't ask tough questions



Houem Rabah

Fillipe Carmo

Song Huang

