



Étude du dialogue hôte/bactéries lactiques du yaourt chez des rats gnotobiotiques

Leila Ben Yahia

► To cite this version:

Leila Ben Yahia. Étude du dialogue hôte/bactéries lactiques du yaourt chez des rats gnotobiotiques. Microbiologie et Parasitologie. AgroParisTech, 2012. Français. NNT : 2012AGPT0028 . pastel-00780715

HAL Id: pastel-00780715

<https://pastel.hal.science/pastel-00780715>

Submitted on 24 Jan 2013

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

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



Doctorat ParisTech

THÈSE

pour obtenir le grade de docteur délivré par

**L'Institut des Sciences et Industries
du Vivant et de l'Environnement**

(AgroParisTech)

Spécialité : Microbiologie

présentée et soutenue publiquement par

Leila BEN YAHIA

le 22 mars 2012

Etude du dialogue hôte/bactéries lactiques du yaourt chez des rats gnotobiotiques

Directeur de thèse : **Muriel THOMAS**

Co-encadrement de la thèse : **Françoise RUL**

Jury

Mme Marielle BOUIX, Professeur, INRA, AgroParisTech

Mme Véronique BRAESCO, Directeur de recherches, INRA

Mme Christine DELORME, Chargée de recherches, INRA

Mme Marie-Christine CHAMPOMIER-VERGES, Directeur de recherches, INRA

Mr Gwénaél JAN, Chargé de recherches, INRA, AGROCAMPUS OUEST

Mme Muriel THOMAS, Chargée de recherches, INRA

Mr Denis Mater, Coordinateur de la Mission Scientifique de Syndifrais

Mme Françoise RUL, Chargée de recherches, INRA

Présidente

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Invité

Invitée

Remerciements

Je remercie Marielle Bouix, Véronique Braesco, Christine Delorme, Marie-Christine Champomier-Vergès et Gwénaél Jan d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Merci pour le temps que vous consacrez à l'évaluation de mon travail.

Je remercie le comité scientifique de Syndifrais qui a soutenu les deux projets dans lesquels s'insèrent ma thèse et particulièrement Denis Mater pour tout l'intérêt qui l'a porté à mon travail.

Je remercie également les membres de mon comité de thèse Valérie Gaboriaud et Patrick Veiga. Pour moi, cela a été des moments privilégiés pour échanger et discuter de mon travail de thèse.

Je remercie Philippe Langella pour m'avoir accueillie au sein de son équipe « Interactions des bactéries commensales et probiotiques avec l'hôte », pour l'énergie qu'il communique à toute son équipe et pour ses idées constructives.

J'adresse aussi mes remerciements à Véronique Monnet pour m'avoir accueillie au sein de son équipe «Peptides et Communication Bactérienne» et tout particulièrement pour ses encouragements.

*Un grand merci à mes deux co-encadrantes, tellement complémentaires, Muriel Thomas et Françoise Rul. Muriel, merci de m'avoir accueillie au sein de la « girl team », de m'avoir encadrée, conseillée et appris tellement de choses ! Françoise, merci de m'avoir encadrée, pour tes conseils, ta disponibilité et de m'avoir permis de découvrir à quel point *S. thermophilus* pouvait être surprenant « petit mais costaud ! ».*

Je tiens à remercier tous les membres de la plateforme Anaxem pour m'avoir appris « la vie en mode germ free ». Merci Pascal pour ta disponibilité et tes conseils. Je remercie aussi Fatima, Anne, Julie et benoit pour leur aide tellement précieuse. Une pensée particulière pour Rosa qui m'a aidé à affronter mes premières peurs...

Je remercie aussi les membres de la plateforme PAPSO, en particulier Didier et Alain pour l'aide que vous nous avez apporté pour les analyses protéomiques.

Je remercie vivement tous les membres de mon équipe en particulier Camille pour tous les bons conseils qu'elle m'a apporté ainsi que son soutien ; Claire, Marie-Louise et Edith pour leur aide et leurs conseils. Un grand merci également à Chantal, Jean-Jacques et Sylvie pour toutes les conversations « microbiologie » et toute la bonne humeur qui va avec.

Je remercie également Colette, Nirina, Emilie et Christophe pour leurs conseils et leur aide au cours de la dernière année de ma thèse.

Un grand merci aux membres des équipes ComBac, Flec et de la plateforme PAPS pour les pauses café du matin... ce fût des moments très agréables.

Une pensée particulière pour les post-doctorants que j'ai connu durant ma thèse : Merci à Julie, Florian, Antonella, Michal, Sylvie, Rebecca, Gaëlle, John et Camille pour tous les bons moments qu'on a passé ensemble ; une pensée aussi pour les doctorants qui ont soutenu leurs thèses Alhosna, Laurie, Williams, Benoît et particulièrement Betty. Je souhaite beaucoup de courage à ceux qui vont soutenir bientôt : Noura, Aurore, Laura, Julie, Nassim, Laure L. et Laure D. Je remercie Pascale K pour tous les bons moments passés ensemble... j'ai découvert le Liban à travers nos discussions.

Je ne remercierai jamais assez ma famille pour son soutien et ses encouragements, en particulier mes parents et mon mari. Je remercie également tous mes amis au nord et au sud de la mer méditerranée et tous ceux qui m'ont encouragé pour que j'aille au bout de mes objectifs. Comme le dit Oscar Wilde : « La sagesse, c'est d'avoir des rêves suffisamment grands pour ne pas les perdre de vue lorsqu'on les poursuit ».

Liste des abréviations

ANC: Apports nutritionnels conseillés

BL : Bactérie lactique

DO : Densité optique

MCD : Milieu chimiquement défini

MRS : de Man, Rogosa and Shape medium

TD : Tractus digestif

UFC : Unité formant colonie

INTRODUCTION GENERALE

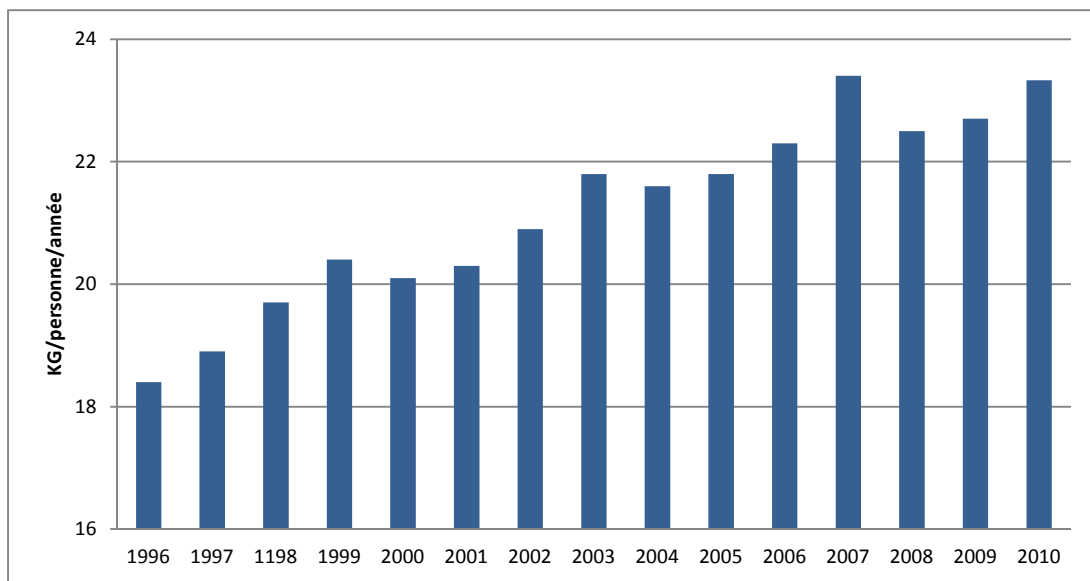


Figure 1: Evolution de la consommation annuelle de yaourts
et laits fermentés en France (Bourlioux *et al.*, 2011)

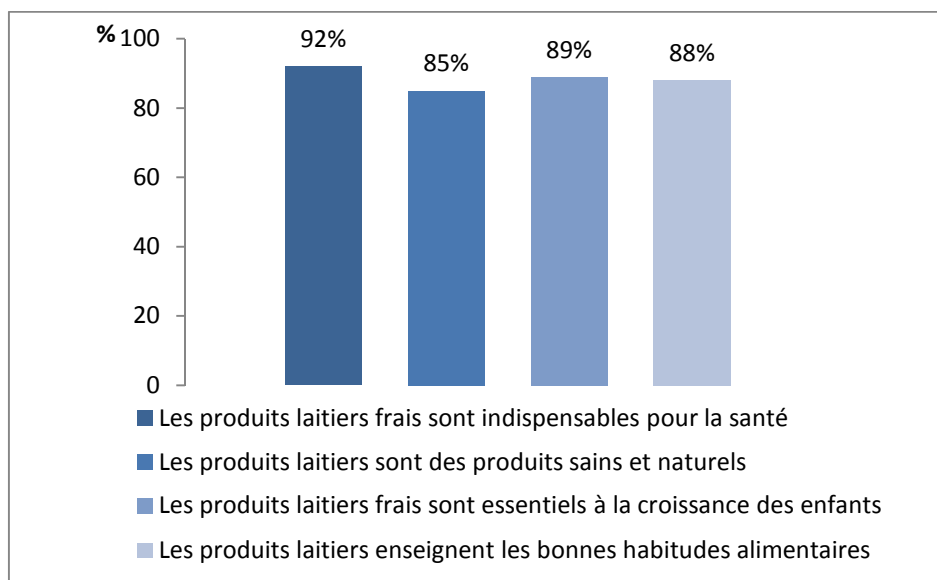


Figure 2 : Perception des produits laitiers frais par les français
(IPSOS/SYNDIFRAIS, 2008)

« De tes aliments, tu feras ta médecine » Hippocrate

La préoccupation d'avoir une alimentation équilibrée est considérée comme la première des conditions pour être en bonne santé par une majorité des Français. Néanmoins, 82% des Français disent qu'il est difficile de se nourrir de façon saine et équilibrée pour la santé (IPSOS/SYNDIFRAIS, 2008). Dans le contexte économique actuel, les consommateurs français délaissent certains produits tels que les produits laitiers, qui sont pourtant essentiels à leur santé.

Malgré l'évolution progressive de la consommation annuelle des yaourts et de laits fermentés de 18.4 à 23.4 Kg/personne/an de 1996 à 2007, un recul a été observé depuis 2007 (Figure 1). La reprise de la consommation amorcée en 2008 est confirmée en 2009 ainsi qu'en 2010 pour atteindre 23.33 Kg/personne/an.

Deux facteurs ont joué en faveur de la reprise de la consommation des produits laitiers : une baisse du « prix de vente consommateur » moyen la plus marquée sur l'ensemble du secteur alimentaire (SYNDIFRAIS, 2011) et le fort ancrage des produits laitiers dans le quotidien des Français (IPSOS/SYNDIFRAIS, 2008).

Les produits laitiers frais tels que les yaourts, les fromages blancs et les desserts lactés sont considérés comme faisant partie du patrimoine alimentaire alliant fraîcheur, diversité, plaisir, tradition et santé. La Figure 2 montre les principales impressions des français sur la consommation des produits laitiers.

Le lait est perçu comme un aliment santé incontournable lié à l'enfance. Le beurre et le fromage se distinguent par leur goût, leur forte dimension de plaisir et de gastronomie. Le fromage est en particulier considéré comme faisant partie du patrimoine français car il véhicule des valeurs de terroir, de convivialité, de tradition. Les yaourts et les desserts lactés, qui font partie de la famille des produits laitiers ultra frais, jouissent d'une image de modernité et de praticité.

Le yaourt associe la notion de plaisir et de santé. Il bénéficie particulièrement d'une image positive aux yeux d'une majorité de français. Cette perception des yaourts par les Français expliquerait le fait qu'ils soient de grands consommateurs de yaourts juste derrière les Allemands avec plus de 21 kilos de yaourts/personne/an. Près de 3 Français sur 4 (72%) déclarent manger des yaourts, des fromages blancs et des desserts lactés au moins une fois

par jour et 39% d'entre eux disent en consommer plusieurs fois par jour (IPSOS/SYNDIFRAIS, 2008).

Si tous les yaourts sont des laits fermentés, tous les laits fermentés ne sont pas des yaourts. On parle de yaourt ou de yoghourt pour désigner les produits laitiers transformés à partir de ferments lactiques spécifiques : *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. Dans un contexte mettant en avant la consommation quasi-quotidienne du yaourt et ses effets bénéfiques sur la santé, nous nous sommes intéressés au devenir du yaourt quand il est ingéré. L'objectif de mon travail de thèse est d'étudier les bactéries du yaourt, et en particulier le métabolisme de la bactérie majoritaire, *Streptococcus thermophilus*, dans le tractus digestif et ses effets sur l'hôte.

Ce manuscrit est constitué de trois parties :

- 1- Une introduction bibliographique présente l'état actuel des connaissances en relation avec mon sujet. Le premier chapitre traite de la composition aussi bien nutritionnelle que microbiologique du yaourt et les effets sur la santé qui lui sont attribués. Le deuxième chapitre présente *Streptococcus thermophilus* et particulièrement son métabolisme du carbone. Le troisième chapitre traite de l'évolution de *Streptococcus* dans le tractus digestif et synthétise les principales études consacrées aux effets de *Streptococcus thermophilus* dans différents modèles.
- 2- Les résultats sont présentés en trois parties: le premier chapitre traite du métabolisme de *Streptococcus thermophilus* dans le tractus digestif de rats gnotobiotiques et ses effets sur l'hôte, le deuxième chapitre présente l'importance du métabolisme du lactose chez *Streptococcus thermophilus in vivo* et le dernier chapitre traite du devenir des deux bactéries du yaourt dans le tractus digestif.
- 3- La conclusion générale permettra de souligner l'apport de ce travail et de le positionner par rapport aux avancées actuelles. Le choix du modèle d'étude ainsi que son impact sur les résultats obtenus seront discutés et comparés à d'autres modèles plus complexes. D'après les résultats que nous avons obtenus, d'autres effets potentiels (directs/indirects) du yaourt sur l'hôte seront proposés.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Le yaourt : atouts nutritionnels et santé

Tableau 1 : Origine de certains laits fermentés (D'après Tamime & Robinson, 1999)

Lait fermenté	Origine
Leben / Leban	Liban et pays de l'orient
Zabady	Egypte et Soudan
Roba	Irak
Dahi / Dadhi	Inde
Tiaourti	Grèce
Cieddu	Italie
Yoghurt / Yogurt / Yaort / Yaourti / Yaghourt	Asie centrale, Balkan → Origines multiples...

1 Origine du yaourt

Les premières preuves de l'existence des produits laitiers fermentés remontent à 6000 ans avant JC en Asie centrale. Les premiers laits fermentés résultent probablement d'une fermentation au contact des bactéries résidant à l'intérieur des sacs de peau de chèvre utilisés pour le transport du lait. L'acidification du lait par fermentation est une des plus anciennes méthodes de conservation du lait en lui conférant des qualités organoleptiques. Différentes méthodes de fermentation dans diverses parties du monde ont donné lieu à toute une gamme de produits de lait fermenté, dont le koumis, le kéfir, le lait acidophile et le yaourt (Tableau 1). Les compositions, les saveurs et les textures de ces produits varient considérablement selon le type de lait et la nature des micro-organismes utilisés pour la fermentation.

Les travaux de Pasteur sur la fermentation en 1857 ont permis d'établir un lien entre la fermentation lactique et les bactéries. Metchnikoff isole en 1904 le « bacille bulgare » (*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*) présent dans le yaourt. Il étudie les propriétés acidifiantes des bactéries du yaourt et il développe l'idée que les bactéries contenues dans les laits fermentés ont un effet bénéfique sur la santé. Il plaidera en faveur de l'introduction de produits laitiers fermentés dans le régime alimentaire. Les premières entreprises fabriquant du yaourt à partir des souches de l'Institut Pasteur voient le jour en 1929 avec Daniel Carasso.

2 Définition réglementaire du yaourt

Le Codex Alimentarius [norme n°A-11 (a)(1975)] et la législation française [Décret n°88-1203 du 30 décembre (1988) relatif aux laits fermentés et au yaourt ou yoghourt] s'accordent sur la définition suivante : « la dénomination "yaourt" ou "yoghourt" est réservée au lait fermenté obtenu, selon les usages loyaux et constants, par le développement des seules bactéries lactiques thermophiles homofermentaires spécifiques dites *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*, qui doivent êtreensemencées simultanément et se trouver vivantes dans le produit fini, à raison d'au moins 10 millions de bactéries par gramme rapportées à la partie lactée. La quantité d'acide lactique libre contenue dans le yaourt ou yoghourt ne doit pas être inférieure à 0,7 gramme pour 100

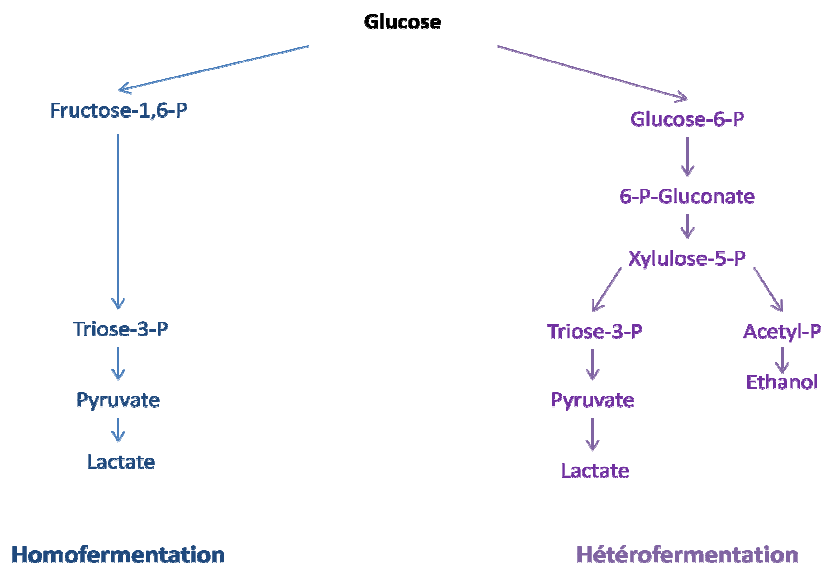


Figure 3: Schéma simplifié de la fermentation du glucose par les BL (Liu *et al.*, 2003)

grammes lors de la vente au consommateur ». L'association de *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* se traduit par un effet synergique sur l'activité acidifiante qui conduit à l'obtention d'un coagulum de consistance plus ou moins ferme.

3 Composition microbiologique du yaourt

Le yaourt est un écosystème simple dont la production repose sur les interactions entre *S. thermophilus* et de *L. bulgaricus*. L'importance technologique de l'évolution de cet écosystème a suscité bien des intérêts. Lors de la fermentation du yaourt, le métabolisme de *S. thermophilus* et de *L. bulgaricus* est le principal responsable de la qualité organoleptique du produit fini.

3.1 Activité acidifiante des bactéries du yaourt

La fermentation des sucres en acide lactique est une caractéristique des bactéries lactiques (BL) qui permet de les classer en bactéries homofermentaires ou hétérofermentaires. Les BL produisant de l'acide lactique uniquement sont homofermentaires tandis que les BL produisant d'autres composés que l'acide lactique tels que l'éthanol, le CO₂ et l'acide formique sont hétérofermentaires (Figure 3). Ainsi le métabolite principal et majoritaire des BL est l'acide lactique.

Ni l'utilisation, ni la racémisation du lactate ne sont connues dans la fermentation du yaourt. L'inconvénient qui se pose par la production du D-lactate est qu'il n'est pas métabolisé par l'homme (Hove & Mortensen, 1995). Bien que la plupart des BL utilisées produisent du L-lactate ou DL-lactate, certaines souches de *L. bulgaricus* produisent seulement du D-lactate (Tamime & Deeth, 1980). Néanmoins, il existe des souches de *L. bulgaricus* qui produisent du L-lactate ainsi que D-lactate (Turner & Martley, 1983).

3.2 Association de *S. thermophilus* et de *L. bulgaricus*

L'association de ces deux bactéries allie à la fois une relation de compétition (compétition pour les nutriments disponibles dans le milieu de croissance) et une relation de mutualisme (synthèse et dégradation de métabolites pour l'autre bactérie). L'interaction entre *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* dans un milieu laitier est décrite par le terme écologique de proto-coopération. La proto-coopération est la base pour la création de la

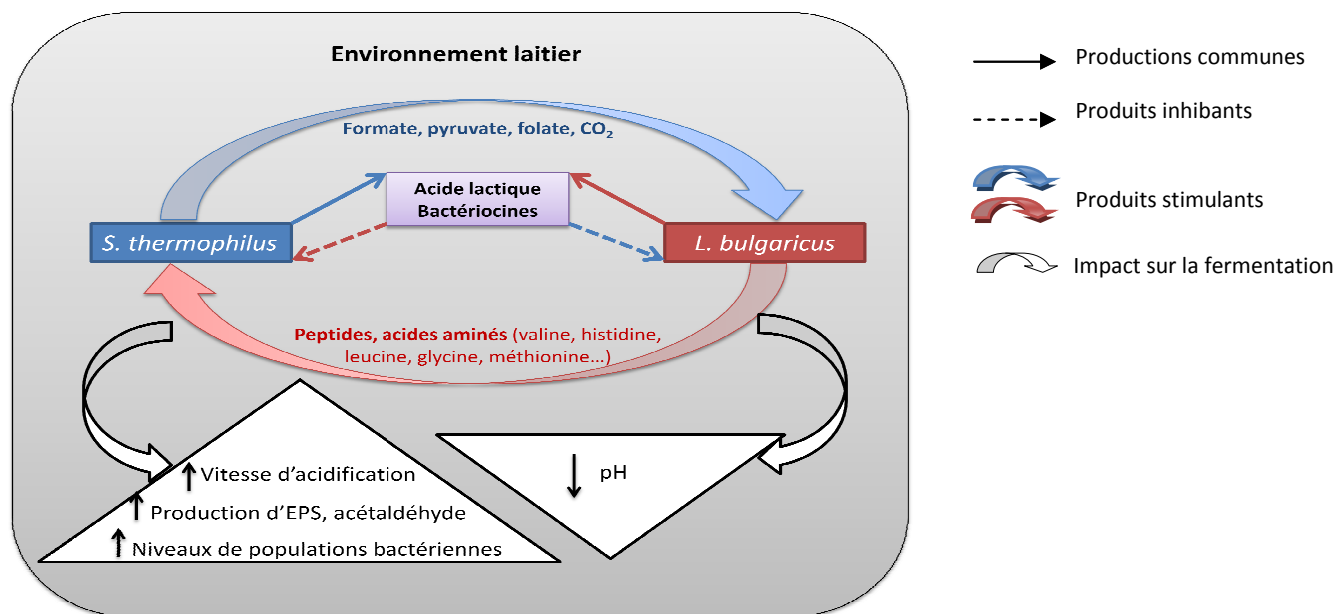


Figure 4 : Représentation schématique des interactions entre *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* dans un environnement laitier (D'après Sieuwerts *et al.*, 2008)

Tableau 2 : Récapitulatif des principales études effectuées sur les facteurs stimulant la croissance de *S. thermophilus* ou de *L. bulgaricus* (D'après Juillard *et al.*, 1987)

Références	Facteurs de stimulation de <i>S. thermophilus</i>
(Pette & Lolkema, 1950)	Acides aminés (Valine, Leucine, Isoleucine, Histidine)
(Bautista <i>et al.</i> , 1966)	Glycine, Histidine
(Higashio <i>et al.</i> , 1978)	Valine, Glycine, Histidine, Glutamate, Leucine
(Bracquart <i>et al.</i> , 1977)	Glutamate, Methionine, Tyrosine, Cystéine, Phénylalanine, Histidine, Arginine
Références	Facteurs de stimulation de <i>L. bulgaricus</i>
(Accolas <i>et al.</i> , 1971)	Formate, Adénine
(Higashio <i>et al.</i> , 1978)	Formate, Pyruvate
(Driessen <i>et al.</i> , 1982)	Formate, CO ₂
(Crittenden <i>et al.</i> , 2003; Van De Guchte <i>et al.</i> , 2006)	Folate

relation symbiotique entre les deux espèces (*S. thermophilus* et *L. bulgaricus*) et un métabolisme combiné avec des effets positifs sur le produit fermenté. Bien que *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* soient capables de fermenter le lait individuellement, leurs croissances et leurs métabolismes sont stimulés en cultures mixtes par rapport à des monocultures (Beal & Corrieu, 1991; Tamime & Robinson, 1999). Des études portant sur les mécanismes impliqués au cours de cette association ont décrit des facteurs nutritionnels (Figure 4).

S. thermophilus et *L. bulgaricus* sont en compétition pour les sources d'énergie et de nutriments lors de la fermentation. Dans le lait, un des facteurs limitants est la teneur en azote assimilable. Cela déclenche en premier temps une compétition pour les acides aminés libres et les petits peptides disponibles (Letort *et al.*, 2002). Dans un deuxième temps, *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* sont en concurrence pour les peptides libérés par l'action des enzymes protéolytiques. Pour cela, ils produisent des protéases, des systèmes de transport, et des peptidases (Courtin *et al.*, 2002; Juille *et al.*, 2005; Rul & Monnet, 1997; Sieuwerts *et al.*, 2010). Le taux de croissance et le dynamisme des populations dans les fermentations laitières mixtes sont largement déterminés par la capacité à utiliser efficacement les acides aminés (Zourari *et al.*, 1992). À quelques exceptions près, les souches de *S. thermophilus* de collection ne possèdent pas de protéase de paroi PrtS (Shahbal *et al.*, 1991). En conséquence, la croissance de la plupart des souches de *S. thermophilus* (sauf certaines souches hautement protéolytiques) est fortement stimulée en co-cultures avec des souches de *L. bulgaricus* exprimant la protéase de paroi PrtB (Courtin & Rul, 2004).

La co-culture de *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* est également fondée sur une autre interaction, telle que l'échange de plusieurs facteurs stimulant la croissance. *S. thermophilus* fournit à *L. bulgaricus* l'acide formique, l'acide pyruvique, l'acide folique (Crittenden *et al.*, 2003), et le dioxyde de carbone (Driessen *et al.*, 1982). Les effets stimulants de l'acide formique ou l'acide folique sur la croissance de *L. bulgaricus* sont liés à leur capacité stimuler la biosynthèse des purines (Galesloot & Hassing, 1968). La pyruvate formate lyase est une protéine très abondante chez *S. thermophilus* lors de sa croissance dans le lait, ce qui indique que *S. thermophilus* pourrait fournir à *L. bulgaricus* du formate au cours des croissances en co-culture (Derzelle *et al.*, 2005). Le tableau 2 synthétise les principales études effectuées sur les facteurs stimulant la croissance de *S. thermophilus* ou de *L.*

Tableau 3 : Composition nutritionnelle de différents types de yaourts
pour 100 g de produit (Anses, 2008)

	Energie (Kcal)	Eau (g)	Protéines (g)	Glucides (g)	Lipides (g)
Yaourt nature au lait entier	70.6	86.5	3.8	5	3.6
Yaourt nature au lait partiellement écrémé	47.7	88.2	4	4.8	1.02
Yaourt nature 0% au lait écrémé	42	88.6	4.4	5.1	0.07
Yaourt aromatisé sucré au lait demi-écrémé	84.8	81.1	3.1	14.2	1.4
Yaourt aux fruits sucré au lait demi-écrémé	91.8	77.6	3.2	15.2	1.69

bulgaricus et montre la prévalence des acides aminés en tant que facteurs stimulant la croissance de *S. thermophilus*.

D'autres facteurs régissant ces interactions ont également été signalés. Certaines souches de *L. bulgaricus* produisent une bactériocine qui inhibe la croissance de *S. thermophilus* (Miteva *et al.*, 1998). En outre, certaines souches de *S. thermophilus* produisent également des bactériocines mais *L. bulgaricus* n'y est pas sensible à (Fontaine & Hols, 2008; Ivanova *et al.*, 1998).

L'association des deux bactéries favorise souvent une augmentation de l'activité acidifiante. Toutefois cette activité est souche-dépendante (Sodini *et al.*, 2000). En effet, l'acidité du milieu inhibe la croissance de *S. thermophilus* alors que la croissance de *L. bulgaricus* ne s'arrête qu'autour de pH 4,4 (Beal & Corrieu, 1991).

La résultante de toutes ces interactions entre *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* lors de la co-culture aboutit généralement à un avantage numérique de *S. thermophilus* (Beal *et al.*, 1994; Courtin & Rul, 2004; Herve-Jimenez *et al.*, 2009; Pette & Lolkema, 1950). La relation entre *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* influe sur les caractéristiques organoleptiques, la fermentation du lait et apporte des spécificités nutritionnelles et des fonctionnalités santé.

4 Apports nutritionnels du yaourt

Les valeurs nutritionnelles du lait sont tout à fait transposables au yaourt. En effet, le yaourt concentre les qualités nutritionnelles du lait auxquelles s'ajoutent les propriétés apportées par les ferments lactiques. Plusieurs facteurs interviennent dans la composition finale du yaourt :

- les souches utilisées pour la fermentation du lait ;
- la nature du lait utilisé (entier, demi-écrémé ou écrémé) ;
- l'ajout éventuel d'ingrédients qui interviennent sur la composition des produits (sucres, arômes, fruits...) ;
- les procédés de fabrication (température, durée de fermentation...).

Grâce à sa haute teneur en eau de plus de 80%, le yaourt est un aliment hydratant (Tableau 3). Il contient du lactose qui est la source de carbone majoritaire. Pendant la fermentation, ce disaccharide est hydrolysé par la β -galactosidase bactérienne en glucose et galactose (Hutkins *et al.*, 1985a; Zourari *et al.*, 1992). C'est aussi une source de protéines

Tableau 4 : Teneur en acides gras de différents types de yaourts et de fromages
pour 100 g de produit (Anses, 2008)

	AG saturés	AG mono-insaturés	AG polyinsaturés
Yaourt nature au lait entier	2.22	0.99	0.9
Yaourt nature au lait partiellement écrémé	0.64	0.28	0.02
Yaourt nature 0% au lait écrémé	0.04	0.01	0.002
Fromage : Comté	18.8	9.7	1.11
Fromage blanc type petit suisse 20% MG/MS nature	3.21	1.44	0.16

Tableau 5 : Apport en oligo-nutriments de 100 g de yaourt (Anses, 2008)

Oligo-éléments	Yaourt nature au lait partiellement écrémé (100 g)	% ANC
Magnésium	12.8 mg	4%
Phosphore	99 mg	16%
Calcium	143 mg	20%
Fer	0.13 mg	1.4%
Zinc	0.63 mg	7%
Sélénium	1.5 µg	2.5%

Tableau 6 : Apport en vitamines de 100g de yaourt (Anses, 2008)

	Yaourt nature partiellement écrémé (100 g)	% ANC
Vitamine D	0.2 µg	4%
Vitamine B1 (Thiamine)	0.05 mg	3%
Vitamine B2 (Riboflavine)	0.25 mg	14%
Vitamine B3 (Niacine)	0.22 mg	1%
Vitamine B5 (Acide pantothénique)	0.42 mg	7%
Vitamine B6 (Pyridoxine)	0.05 mg	4%
Vitamine B9 (Folate)	25 µg	8%
Vitamine B12	0.22 µg	6%

avec 5 g de protéines par pot, valeur supérieure à la teneur en protéines du lait, suite à l'ajout de poudre de lait écrémé lors de la fabrication du yaourt. Ainsi les caséines et les protéines du lactosérum présentent une source riche en acides aminés (Shahani & Chandan, 1979) car les protéines du yaourt sont plus digestibles que celle du lait suite à leur hydrolyse par les bactéries lactiques (Oberg *et al.*, 1991; Thomas & Pritchard, 1987; Zourari *et al.*, 1992). Un yaourt pèse en moyenne 125 g mais sa composition nutritionnelle présentée (Tableau 3) est exprimée pour 100 g quels que soient les produits.

➤ Apport modéré en énergie :

La teneur en matière grasse du yaourt dépend de la nature du lait utilisé. Le yaourt est le produit laitier qui contient le moins de matière grasse en comparaison avec d'autres produits comme les fromages (Tableau 4). Cette matière grasse est aux 2/3 une matière grasse saturée mais ne représente au plus que 2.4% de la composition du yaourt. Le yaourt reste donc un aliment à apport modéré en énergie.

➤ Apport en minéraux et vitamines :

Le yaourt est particulièrement riche en minéraux et oligo-éléments (Tableau 5). Un pot de yaourt couvre 13% des besoins journaliers en phosphore et 16% des besoins de calcium d'un adulte. Lors de la fermentation du yaourt, l'acide lactique produit permet la solubilisation du calcium (Tamime & Robinson, 1999). L'absorption du calcium au niveau de l'intestin se fait par un transport passif ou par un transport actif quand la quantité de calcium ingérée est inférieure à 800 mg. L'apport de calcium assuré par un pot de yaourt peut jouer un rôle dans sa propre absorption en stimulant le transport actif au niveau du duodénum (Bronner & Pansu, 1999).

Le yaourt est aussi une source de vitamines (Shahani & Chandan, 1979) (Tableau 6). Ces vitamines sont hydrosolubles et ne sont donc pas stockées dans l'organisme (à l'exception de la vitamine B12). De ce fait leurs apports doivent être assurés quotidiennement par notre alimentation. Ces vitamines sont impliquées dans de nombreuses fonctions: construction (croissance, développement du squelette...), fonctionnement et entretien de divers tissus et systèmes (transformation et utilisation des macronutriments, coagulation du sang...).

Ainsi le yaourt apparaît un aliment de choix dans le cadre d'une alimentation équilibrée. En effet, il est riche en protéines et assure un apport de vitamines et d'oligo-éléments, particulièrement le calcium, tout en ayant un apport énergétique modéré.

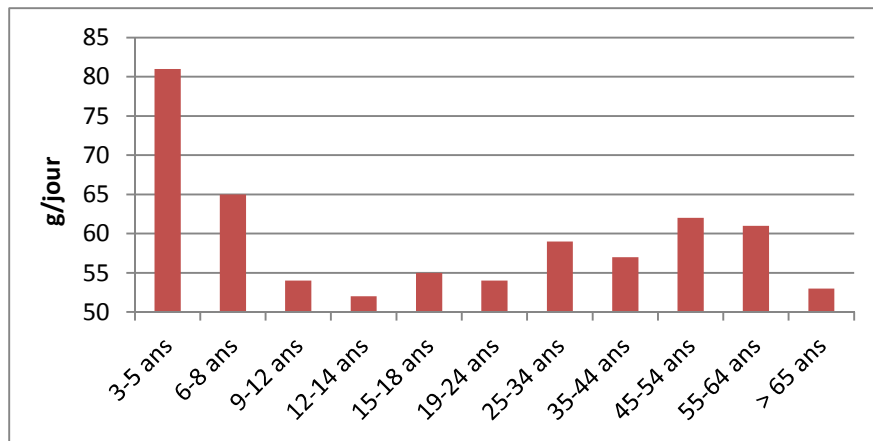


Figure 5: Consommation de yaourts et laits fermentés en fonction de l'âge (D'après Bourlioux *et al.*, 2011)

5 Effets du yaourt sur la santé

Plusieurs études ont rapporté les effets bénéfiques des laits fermentés sur la santé. Ces effets dépendent à la fois des souches utilisées et des métabolites produits. L'effet le plus étudié qui a valu la dénomination « probiotique » par l'EFSA au yaourt est l'amélioration de la digestion du lactose. D'autres études ont porté sur l'effet du yaourt sur les diarrhées ou l'immunité. Malgré cela, les études portant sur ces effets du yaourt sont restreintes.

Rappel de certaines maladies liées à la malnutrition

Il est important de rappeler certaines maladies dont la prévalence est élevée en partie à cause d'un régime alimentaire déséquilibré. Le programme national de nutrition et de santé (PNNS) recommande la consommation de trois à quatre produits laitiers par jour. Pourtant, les enquêtes alimentaires menées en France ces dernières années montrent que la consommation des produits laitiers est insuffisante. La consommation des yaourts et laits fermentés varie selon les âges comme indiqué dans la Figure 5 et montre des disparités et une baisse chez les adolescents.

Parmi les maladies liées à une alimentation déséquilibrée ou carencée posant un réel problème de santé publique en France, deux maladies ont attiré notre attention : l'obésité et l'ostéoporose.

L'insuffisance de la consommation de lait et de laitages pendant l'adolescence, avec l'apport très insuffisant de calcium qui en résulte à cette période de la vie déterminante pour la minéralisation osseuse, est un problème majeur, en particulier chez les filles. Les sujets ayant un apport en calcium inférieur au besoin nutritionnel moyen étaient de 73,5% pour les filles de 10 à 19 ans et de 62,4% pour les garçons de 15 à 19 ans (INCA2, 2007). L'exclusion de l'apport lacté pendant l'enfance influence également la santé osseuse à long terme, et en particulier le risque d'ostéoporose et de fractures chez la femme après la ménopause. L'ostéoporose chez les personnes âgées constitue actuellement une préoccupation majeure en matière de santé publique, en raison des fractures, des douleurs, des invalidités et de la surmortalité qu'elle génère. La prévention de l'ostéoporose repose notamment sur l'obtention d'un pic de masse minérale osseuse le plus élevé possible chez l'adulte jeune.

En 2009, 31.9% des Français adultes étaient en surpoids et 14.5% étaient obèses. Dans cette population, la prévalence de l'hypertension artérielle traitée est de 18.4%. Elle a

augmenté de 1.5% par rapport à 2006. Le risque d'être traité pour l'hypertension artérielle est multiplié par 2.5 chez les sujets en surpoids et par 4 chez les obèses (Obépi-Roche, 2009). La prévalence des dyslipidémies traitées (hypercholestérolémie ou hypertriglycémie mixte ou isolée) est multipliée par 2 en cas de surpoids et par presque 3 en cas d'obésité (vs sujets de corpulence normale). 5,4% des adultes déclarent être traités pour un diabète. Au vu de ses maladies, un régime alimentaire équilibré pourrait prévenir la majorité d'entre elles.

5.1 Effet de la composition nutritionnelle du yaourt sur la santé

Le yaourt exerce des effets bénéfiques sur la santé grâce à sa composition nutritionnelle. La richesse en protéines des yaourts leur confèrent un effet satiétogène (Chapelot & Payen, 2010; Tsuchiya *et al.*, 2006), ce qui permet, dans le cadre d'une alimentation équilibrée, de lutter contre l'obésité. D'autre part, des essais cliniques ont permis de montrer qu'un yaourt enrichi en vitamine D permet d'améliorer la glycémie des patients souffrant du diabète du type 2 (Nikooyeh *et al.*, 2011).

5.2 Effet de la composition microbiologique du yaourt sur la santé

➤ **effet du yaourt sur la digestion du lactose**

Une relation de cause à effet a été établie entre la consommation de bactéries vivantes du yaourt et l'amélioration de la digestion du lactose chez les personnes ayant une intolérance au lactose (EFSA, 2010). L'incapacité à digérer le lactose, cause de l'intolérance au lactose chez l'homme, a été attribuée à des quantités insuffisantes de la lactase intestinale.

Afin de porter l'allégation, l'EFSA souligne l'importance du caractère vivant des ferments qui doivent contenir au moins 10^8 UFC de micro-organismes vivants par portion. Chez l'Homme, plusieurs des études ont comparé la digestion du lactose après ingestion d'un yaourt frais, d'un yaourt thermisé, d'un produit laitier fermenté et de lait. Ces études utilisent le test BHC (breath hydrogen concentration) (Tableau 7). Chez les personnes ne digérant pas le lactose, ce sucre traverse intact l'intestin grêle et arrive jusqu'au colon où il est fermenté par le microbiote colique. Cette fermentation produit différents gaz dont l'hydrogène. L'hydrogène est retrouvé dans l'air expiré en quantité proportionnelle à la quantité de lactose arrivant

Tableau 7 : Principales études démontrant l’effet du yaourt sur l’amélioration de la digestion au lactose (plus l’excrétion d’hydrogène (EH) est élevée plus la digestion du lactose est bonne) (EFSA, 2010)

Références	Population et effectif	Produits étudiés	Lactose	Résultat relatif à l'excrétion d'hydrogène (EH)
Kolars et al., 1984	10 malabsorbeurs (20-28 ans).	yaourt (440g)	18 g	Après ingestion d'un yaourt, l’EH est trois fois plus faible qu’après ingestion de lait ou d’une solution contenant du lactose
		lactose dans de l’eau	20 g	
		lait (400 ml)	18g	
Savaiano et al., 1981	9 malabsorbeurs (20-28 ans)	yaourt (500 g)	20g	l’EH est 3 à 5 fois moindre après ingestion de yaourt qu’après ingestion des autres produits. La différence entre yaourt et lait ou laits fermentés est significative et celle entre le yaourt avant et après thermisation tend vers la signification
		lait fermenté thermisé (500g)		
		lait fermenté par <i>L. acidophilus</i>		
		lait fermenté (ferments du babeurre)		
Dewitt et al., 1988	16 malabsorbeurs (17-36 ans)	lait (410 g)	18g	Chez les malabsorbeurs, l’EH est 6 à 8 fois moindre après ingestion de yaourt qu’après ingestion lait ou de solution de lactose.
		yaourt		
		lactose dans de l’eau		
	10 malabsorbeurs (17-36 ans)	lait	18g	Chez les malabsorbeurs, l’EH est 8 fois moindre après ingestion de contenant des bactéries vivantes qu’après ingestion du produit chauffé.
		yaourt		
Lerebours et al., 1989	16 malabsorbeurs (18-26 ans)	lait fermenté thermisé	18 g	l’EH est 3 fois moindre après consommation de yaourt par rapport au lait alors qu’elle est identique après consommation de lait fermenté puis thermisé, par rapport au lait.
		yaourt (375g)		
		lait fermenté thermisé (375g)		
Marteau et al., 1990	8 malabsorbeurs (19-27 ans)	lait (440 ml)	18g	l’EH est 4 fois moindre après consommation de yaourt frais que de lait et deux fois moindre par rapport au yaourt chauffé
		yaourt (450 g)		
		lait fermenté thermisé (450g)		
		lait (400ml)		
Onwalata et al., 1989	13 sujets, dont 10 malabsorbeurs (25-32 ans)	Yaourt	18g	l’EH est 3 fois moindre après consommation de yaourt ou de lait délactosé qu’après consommation de lait (avec ou sans lactase) ou de lait fermenté
		lait fermenté par <i>L. acidophilus</i>		
		Lait		
		lait (lactose hydrolysé)		
		lait + lactase en comprimé		
Martini et al., 1991	7 malabsorbeurs (23-33 ans)	Yaourt commercial, marque A	18g	l’EH est 5 fois moindre après consommation de chacun des yaourts qu’après consommation de lait. Bien que préparés avec des souches différentes de <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> et <i>S. thermophilus</i> , les différents yaourts commerciaux diminuent l’EH de façon comparable.
		yaourt commercial, marque B		
		yaourt commercial, marque C		
		yaourt commercial, marque D		
		Lait		
Rosado et al., 1992	12 malabsorbeurs (19-26 ans)	Yaourt	15g	l’EH est 17 fois moindre après consommation de yaourt qu’après consommation de lait. La fermentation par des bactéries isolées entraîne des excréments diminuées par rapport au lait, les bactéries de la symbiose yaourt étant les plus efficaces.
		lait fermenté par <i>L. bulgaricus</i>		
		lait fermenté par <i>S. thermophilus</i>		
		lait fermenté par une bifidobactérie		
	14 malabsorbeurs (23-33 ans)	lait fermenté par <i>L. acidophilus</i>	18g	l’EH est 3 à 8 fois moindre après consommation des yaourts qu’après consommation de lait. Les yaourts, préparés avec des
		yaourt A (lait entier)		
		yaourt B (lait entier)		

			yaourt C (lait écrémé) yaourt (lait dé lactosé) lait yaourt lait fermenté thermisé lait	20g 3,6g 18g	souches différentes de <i>L. bulgaricus</i> et <i>S. thermophilus</i> diminuent l'EH de façon comparable pour les deux yaourts au lait entier.
Varela-Moreiras et al., 1992	19 malabsorbeurs (67-95 ans)			11g	l'EH est 3 fois moindre après consommation de yaourt qu'après consommation de lait, et 1,5 fois moindre qu'après consommation de produit thermisé.
Shermak et al., 1995	14 malabsorbeurs (4-16 ans)		yaourt lait fermenté thermisé (500g) lait	12g	la quantité d'EH n'est pas significativement différente, quel que soit le produit ingéré, mais le pic d'excrétion est plus aigu et plus précoce après consommation de lait que de yaourt.
Rizkalla et al., 2000	24 sujets, dont 12 malabsorbeurs (20-60 ans)		yaourt (500g) lait fermenté thermisé (500g)	30g	Chez les malabsorbeurs, l'EH est 2 fois moindre après consommation de yaourt qu'après consommation de yaourt chauffé.
Labayen et al., 2001	22 malabsorbeurs (22 ans en moyenne)		yaourt (500g) lait fermenté thermisé (500g)	25,7g 25,5 g	l'EH est moindre après consommation de yaourt qu'après consommation de yaourt chauffé.
Pelletier et al., 2001	24 malabsorbeurs (21-35 ans)		yaourt lait fermenté thermisé yaourt dilué A, yaourt dilué B lait gélifié	25g	L'EH est moindre après consommation de yaourt qu'après consommation de tous les autres produits. Les yaourts dilués et thermisés génèrent une excrétion d'hydrogène intermédiaire entre lait et yaourt.

dans le colon, et donc inversement proportionnelle au degré de digestion du lactose dans l'intestin. Ces études montrent une plus grande excrétion d'hydrogène, donc une moindre digestion du lactose après consommation des produits thermisés par rapport aux yaourts frais. Certaines études ont suivi l'intensité des symptômes gastro-intestinaux des sujets digérant peu ou pas le lactose. Elles concluent à une moindre incidence ou une moindre intensité des douleurs abdominales, flatulences ou ballonnements après ingestion de yaourts par rapport à un produit laitier fermenté thermisé et, de manière encore plus nette, par rapport à du lait. L'amélioration de la digestion du lactose se fait grâce à l'activité de la β -galactosidase (enzyme hydrolysant le lactose) de *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* dans le TD. Cette activité est presque dix fois plus importante dans le yaourt frais que dans le yaourt pasteurisé (Savaiano *et al.*, 1984).

La quantité de lactose digérée dépend à la fois de l'activité des enzymes bactériennes du yaourt mais aussi du nombre de bactéries présentes. Une étude clinique de type dose-réponse (Pelletier *et al.*, 2001a) a montré qu'un produit dont la concentration bactérienne est de 10^6 UFC/g ou moins améliore peu la digestion du lactose, alors qu'un yaourt contenant 10^8 UFC/g permet de supprimer l'excrétion d'hydrogène, suggérant que la majeure partie du lactose ingéré est digérée. Ceci est parfaitement cohérent avec l'ensemble des études citées, dans lesquelles la digestion de 12 à 25 g de lactose est améliorée après ingestion de 250 à 500 g de yaourt contenant au moins 10^7 UFC/g et, le plus souvent, 10^8 UFC/g.

➤ **Autres effets du yaourt sur la santé**

D'autres études portent sur les effets du yaourt sur la santé. Ces études, peu nombreuses ont été réalisées chez l'homme et l'animal. Elles portent sur la stimulation du système immunitaire, la prévention du cancer, de certaines maladies inflammatoires et divers autres effets présentés ci-dessous.

- **Effet sur le microbiote** : avec l'espérance de vie des populations européennes qui ne cesse d'augmenter, « bien vieillir » se pose comme un défi. Une étude a été menée sur l'effet de la consommation de yaourt chez des personnes âgées (78.3 ± 9.8 ans). Une baisse significative des *Clostridia* a été observée (Canzi *et al.*, 2002), ce qui est

considéré comme bénéfique pour la santé car les *Clostridia* génèrent des produits de putréfaction potentiellement toxiques pour la muqueuse colique.

- **Effet sur les diarrhées et les infections intestinales :** l'administration de yaourt à 112 enfants ne souffrant pas de mal-nutrition (âgés de 3 à 24 mois) permet de réduire la durée et la fréquence des diarrhées non sanglantes (Boudraa *et al.*, 2001) quand celles-ci ne sont pas causées par une intolérance au lactose. D'autre part, l'administration de yaourt semble aussi efficace et moins coûteuse que l'administration du probiotique *Saccharomyces boulardii* chez des enfants (âge moyen 21.1 ± 2.88 mois) (Eren *et al.*, 2010). Des études réalisées chez les animaux montrent que la consommation de yaourt ne protège pas contre la salmonellose, mais réduit considérablement la mortalité et la perte de poids chez des rats (Hitchins *et al.*, 1985). Une réduction de la mortalité a aussi été observée chez des souris infectées avec *Salmonella typhimurium* par une alimentation enrichie en yaourt (Simone *et al.*, 1988).
- **Stimulation du système immunitaire :** des études portant sur l'effet du yaourt sur l'immunité ont montré à la fois un effet pro-inflammatoire et anti-inflammatoire et cela est probablement relié aux différentes souches utilisées. La consommation régulière de yaourt stimule le système immunitaire chez l'homme (deux groupes : jeunes adultes âgés de 20 à 40 ans et seniors âgés de 55 à 70 ans) et diminue les symptômes d'allergie (Van de Water *et al.*, 1999). Le yaourt a un effet pro-inflammatoire en stimulant la production de cytokines et plus particulièrement d'IL-1 β et de TNF- α chez des hommes de moyenne d'âge de 24.4 (Meyer *et al.*, 2007).
- **Prévention du cancer :** une étude clinique (sur une période s'étalant jusqu'à 12 ans) montre que la consommation de yaourt réduit les risques de cancer colorectal en particulier des hommes (Pala *et al.*, 2011).
Chez des souris, la consommation de yaourt peut prévenir du risque du cancer du colon en exerçant une activité anti-tumorale et ce en augmentant l'apoptose (LeBlanc & Perdigon, 2004). Cette apoptose peut être à l'origine d'une diminution de la réponse immunitaire inflammatoire médiée par l'augmentation des IgA, la

libération d'IL-10 et l'induction de l'apoptose chez des souris (Perdigón *et al.*, 2002). Elle peut aussi agir en diminuant les taux d'enzymes pro-carcinogéniques dans le contenu caecal chez des souris (Rachid *et al.*, 2002). L'administration de yaourt à des souris présentant des tumeurs induites par le 1,2-diméthylhydrazine dihydrochloride réduit significativement le nombre de tumeurs (Narushima *et al.*, 2010).

- **Prévention des maladies inflammatoires** : dans le cas de maladies inflammatoires de l'intestin telles que la maladie de Crohn ou les colites ulcéraives, l'administration de yaourt pendant la période de rémission prévient la récurrence de l'inflammation sans pour autant avoir des effets secondaires indésirables chez des souris (Chaves *et al.*, 2011). Les bactéries du yaourt induisent la production d'interleukines β chez des souris (Solis-Pereyra *et al.*, 1997). *In vitro*, elles induisent la production d'interférons α et β chez des cellules PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell).
- **Effet anti-grippe** : chez des souris, le yaourt, et plus particulièrement les exopolysaccharides acides excrétés par *L. bulgaricus*, exerce un effet antigrippe (Nagai *et al.*, 2011).

L'ensemble de ces données sur le yaourt mettent en avant ses atouts nutritionnels ainsi que les bénéfices de ses ferments sur la santé.

Chapitre 2 : *Streptococcus thermophilus*, bactérie majoritaire du yaourt

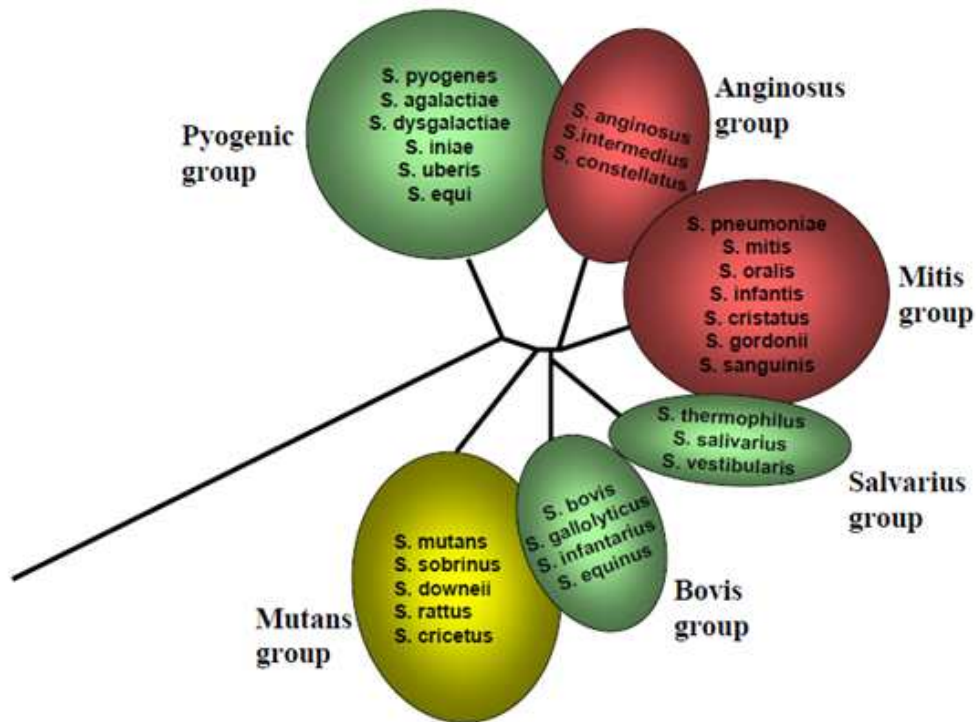


Figure 6 : Relation phylogénique entre 34 espèces de *Streptococcus* (D'après Håvarstein, 2010).

Tableau 8 : Evolution des outils de classification des bactéries
(D'après Schleifer *et al.*, 1991)

	Classification basée principalement sur
Fin du 19 ^{ème} siècle	Morphologie, Besoins spécifiques de croissance, Potentiel pathogène
1900 – 1960	Morphologie, Physiologie, Biochimie
1960 – 1980	Chimiotaxonomie, Taxonomie numérique, Hybridation ADN-ADN
1980 à aujourd'hui	Analyse génotypiques, « Multilocus Sequence Analyses » (MLSA), « Average Nucleotide Identity » (ANI)

Plusieurs études ont porté sur la physiologie de *S. thermophilus* et de *L. bulgaricus* dans le yaourt et dans le lait. Ces études ont montré l'adaptabilité des ferments du yaourt au milieu laitier et particulièrement à sa composition riche en lactose (source de carbone majoritaire). Dans ce chapitre, je présenterai la bactérie majoritaire du yaourt *S. thermophilus* ainsi que son métabolisme des sources carbonées qui lui a permis en grande partie de s'adapter à son environnement laitier.

1 Classification phylogénétique et analyse génétique de *S. thermophilus*

1.1 Classification génétique

S. thermophilus appartient au phyla des Firmicutes, à la classe des *Bacilli*, au sous-ordre des *Lactobacillales* (Makarova *et al.*, 2006a). Il a été décrit en 1919 par Orla-jensen sur la base de critères phénotypiques, comme streptocoque appartenant au groupe des bactéries lactiques. Les *Streptocoques* ont d'abord été identifiés sur la base de leur pouvoir hémolytique et antigénique, la nature de leur antigène polysaccharidique de paroi (Lancefield, 1933) et des tests phénotypiques (Facklam, 2002). Des espèces de streptocoques sont classées par des comparaisons des séquences du gène codant pour l'ARN ribosomal (ARNr) 16S en association avec des critères phénotypiques (Giraffa *et al.*, 2001; Milinovich *et al.*, 2008; Shewmaker *et al.*, 2007; Takada & Hirasawa, 2008; Vela *et al.*, 2009). L'analyse comparative de l'ARNr 16S a permis de classer *S. thermophilus* dans le genre *Streptococcus* qui comprend 6 espèces : *pyogenic*, *anginosus*, *mitis*, *bovis*, *mutans* et *salivarius* (Kawamura *et al.*, 1995; Lal *et al.*, 2011; Pombert *et al.*, 2009) (Figure 6).

La classification des bactéries en général a évolué au cours du temps notamment en fonction des techniques émergentes utilisées (Tableau 8) ce qui a joué un rôle dans la classification de *S. thermophilus*. *S. thermophilus* avait été initialement classé comme une sous-espèce de *S. salivarius* (*Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*) (Farrow & Collins, 1984; Sherman, 1937). Cependant, en 1991, Schleifer et ses collaborateurs ont fourni des preuves, basées sur des expériences d'hybridation ADN-ADN, qui confèrent le statut d'espèce à part entière à *S. thermophilus* (Schleifer *et al.*, 1991).

Afin d'identifier et de classer différentes espèces de streptocoques, le séquençage de gènes codant pour la superoxide dismutase à manganèse (Mn-SOD) (Poyart *et al.*, 1998), la

Tableau 9 : Caractéristiques des génomes de différentes souches séquencées de *S. thermophilus*.

Souches <i>S. thermophilus</i>	Taille (Kpb)	% G+C	% gènes codants	Nombre de gènes associés à des voies métaboliques
CNRZ1066	1796	39.08	85	864
LMG 18311	1796	39.09	85	820
LMD-9	1856	39.07	78	788
ND03	1831	39.1	94	
JIM8232	1929	38.9	81.3	

sous-unité β de l'ADN gyrase (GyrB), la sous-unité β de l'ARN polymérase (RpoB) (Glazunova *et al.*, 2009) ou la protéine de recombinaison et de réparation (RecN) (Glazunova *et al.*, 2010) a permis d'effectuer des analyses de phylogénie. Une autre façon d'explorer la diversité génétique de *S. thermophilus* a été d'étudier son génome par l'approche de Multilocus Sequence Typing (MLST). Ainsi, la comparaison des variations des séquences nucléotidiques de huit gènes de ménage (*ilvC*, *pepO*, *pyrE*, *glcK*, *ddlA*, *thrS*, *dnaE* et *tkt*) a permis de montrer que la divergence des séquences est très faible, avec une moyenne de 0,19% (Bolotin *et al.*, 2004; Hols *et al.*, 2005). Cela renforce l'idée que *S. thermophilus* est une espèce émergente.

S. thermophilus est proche de streptocoques pathogènes tels que *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*. En effet, environ 80% des ORFs (Open reading frame) de *S. thermophilus* sont orthologues avec d'autres gènes de streptocoques. *S. thermophilus* et *S. suis* montrent 95% de similitude au niveau nucléotidique du gène codant la protéase de paroi Prts (Delorme *et al.*, 2009). La comparaison des génomes de *S. thermophilus* avec des génomes de streptocoques pathogènes publiés souligne non seulement sa parenté avec les espèces pathogènes, mais révèle également que les déterminants les plus importants pour la pathogénicité sont soit absents, présents en tant que pseudogènes ou codent pour des fonctions cellulaires de base (Bolotin *et al.*, 2004; Hols *et al.*, 2005; Makarova *et al.*, 2006a; Makarova *et al.*, 2006b). La capacité à utiliser différentes sources de carbone est importante pour la virulence de streptocoques pathogènes, et cela en permettant le maintien de ces bactéries dans leur niche écologique (Ajdic *et al.*, 2002; Tettelin *et al.*, 2002). Plus de 30% des pseudogènes chez *S. thermophilus* codent pour le transport et le métabolisme des sucres (Bolotin *et al.*, 2004).

1.2 Analyse du génome de *S. thermophilus*

Les génomes de cinq souches de *S. thermophilus*, les souches CNRZ1066, LMG 18311, LMD-9, ND03 et JIM8232 ont été séquencés (Bolotin *et al.*, 2004; Delorme *et al.*, 2011; Makarova *et al.*, 2006b; Sun *et al.*, 2010). Le tableau 9 synthétise les caractéristiques de leurs génomes (Delorme *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2010).

Les génomes des souches de *S. thermophilus* séquencées sont de petite taille et présentent un faible %G+C. L'absence d'une voie d'évolution claire indique que la

Tableau 10: Gènes spécifiques de *S. thermophilus* LMD-9 (D'après Goh *et al.*, 2011)

ORFs	Fonction putative	Gènes orthologues (% de similarité au niveau des acides aminés)
STER_0150	UDP-glucose 6-deshydrogénase	<i>E. faecalis</i> (90%)
STER_0576	Mucus-binding protein	<i>L. citreum</i> (68%)
STER_0846	Protéine d'enveloppe cellulaire PrtS	<i>S. suis</i> (95%)
STER_1057	PST : famille de transporteurs de polysaccharides EpsU	<i>L. lactis</i> (98%)
STER_0149	Glycosyl-transférase	<i>E. faecalis</i> (90%)
STER_1063	Glycosyl-transférase	<i>E. rectale</i> (67%)
STER_1064	Glycosyl-transférase	<i>R. obeum</i> (80%)
STER_1065	Glycosyl-transférase	<i>E. rectale</i> (90%)
STER_1347	Peptide ABC transporteur, perméase	<i>L. mesenteroides</i> (97%)
STER_1348	Peptide ABC transporteur, ATPase	<i>L. mesenteroides</i> (96%)

recombinaison et le transfert de gènes sont fréquents chez *S. thermophilus*. Ainsi, *S. thermophilus* affiche un faible niveau de polymorphisme. Par ailleurs, le transfert latéral de gènes (TLG) semble avoir contribué à façonner son génome (Hols *et al.*, 2005). Un cas de TLG est l'insertion d'une région de 17 kb dans un gène tronqué *pepD*, englobant une mosaïque de fragments dépassant 90% de similitude avec des séquences d'ADN de *L. bulgaricus* et *L. lactis*. Les clusters de gènes *cbs-cblB(cglB)-cysE* chez *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* ont 94% de similitude au niveau des séquences suggérant un autre cas de TLG (Liu *et al.*, 2009). D'autres cas de TLG sont présentés dans le tableau 10. Ces gènes de la souche *S. thermophilus* LMD-9 impliqués dans l'utilisation des sucres ou des protéines sont orthologues à plus de 65% avec des gènes d'autres bactéries (Goh *et al.*, 2011).

Des transferts de gènes (codant pour des exopolysaccharides) se passent aussi dans l'autre sens à savoir de *S. thermophilus* à *L. bulgaricus* contribuant à l'optimisation de l'interaction de ces deux bactéries dans la synthèse du yaourt (Liu *et al.*, 2009).

10% des gènes de *S. thermophilus* ne sont pas fonctionnels à cause des mutations de la suppression ou la troncature des gènes. Les pseudogènes sont, entre autres, homologues à des gènes impliqués dans le métabolisme carboné, dans le transport et la régulation. Les protéines de transport et le métabolisme énergétique sont concernés avec ≈30% de séquences codantes tronquées se rapportant à la dégradation des glucides, l'absorption et la fermentation. Notamment, la moitié des gènes dédiés à l'absorption de sucres, y compris quatre des sept systèmes de transport de sucre phosphotransférase (PTS), sont des pseudogènes chez *S. thermophilus*. Mais cette dégénérescence ne semble pas s'appliquer de la même façon à toutes les souches. La souche LMD-9 possède un gène codant une protéase de surface PrtS. Cette protéase est ancrée à la surface de la paroi (Fernandez-Espla *et al.*, 2000). Chez *S. thermophilus*, même si cette protéase est similaire à la protéase des streptocoques pathogènes elle n'a pas gardé la même fonction. Elle n'est pas associée à la virulence mais plutôt à une croissance et un taux d'acidification du lait rapides grâce à l'hydrolyse des caséines du lait en apportant des peptides et acides aminés.

Le génome de *S. thermophilus* a évolué par perte de fonctions ainsi que par le transfert latéral de gènes. Ces deux facteurs ont permis une modification de *S. thermophilus* divergente de celles de d'espèces pathogènes et son adaptation au lait. *S. thermophilus* remplit les conditions pour être reconnue par l'EFSA comme QSP (Qualified Presumption of

Safety) et comme GRAS (Generally Recognized As Safe) par l'US Food and Drug Administration.

2 Comparaison des génomes de souches de *S. thermophilus*

Les gènes « core » sont les gènes qui sont présents dans toutes les souches de *S. thermophilus* et représentent probablement les gènes qui sont nécessaires à la survie dans des conditions normalement rencontrées par *S. thermophilus* : dans un environnement laitier (Lefebure & Stanhope, 2007; Rasmussen *et al.*, 2008). Ces gènes représentent 58% du génome de 47 souches de *S. thermophilus*. Les gènes non-core sont des gènes qui ont été récemment acquis ou variables entre les différentes souches (Rasmussen *et al.*, 2008).

Les génomes des souches CNRZ1066, LMG18311 et LMD-9 présentent 83% de similitudes au niveau des ORFs (Open Reading Frame) (Goh *et al.*, 2011). *S. thermophilus* CNRZ1066 et *S. thermophilus* LMG 18311 sont plus semblables et présentent 94% de similitudes au niveau des ORFs (Bolotin *et al.*, 2004). Les principales différences concernent les gènes impliqués dans la biosynthèse de polysaccharides extracellulaires (*eps*, *rgp*) et la synthèse d'une bactériocine (Bolotin *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2009). *S. thermophilus* LMD-9 a 127 ORFs (représentant 6.9% des ORFs) qui lui sont spécifiques sont localisés dans 27 loci (Goh *et al.*, 2011). Approximativement 14 des 27 loci sont concentrés dans des régions distales de l'origine de réplication suggérant la présence de transposases (intactes ou tronquées) comme éléments contribuant significativement à la variation des génomes de *S. thermophilus* (Goh *et al.*, 2011).

La comparaison des génomes des souches de *S. thermophilus* montre que la souche LMD-9 est celle qui présente le plus de différences par rapport aux souches CNRZ1066 et LMG18311 (Liu *et al.*, 2009).

2 Utilisation des sucres et les voies de métabolisation

S. thermophilus est dépendante de la fermentation des sucres pour produire de l'énergie. Cette espèce est incapable de désaminer et de produire de l'ATP à partir de l'arginine. Cela a probablement contribué au développement de *S. thermophilus* en tant que bactérie lactique homofermentaire thermophile hautement adaptée à la croissance sur lactose comme source primaire d'énergie (Van den Bogaard *et al.*, 2000), le lactose étant la principale source d'énergie disponible lors d'une croissance dans du lait. Le rôle principal de

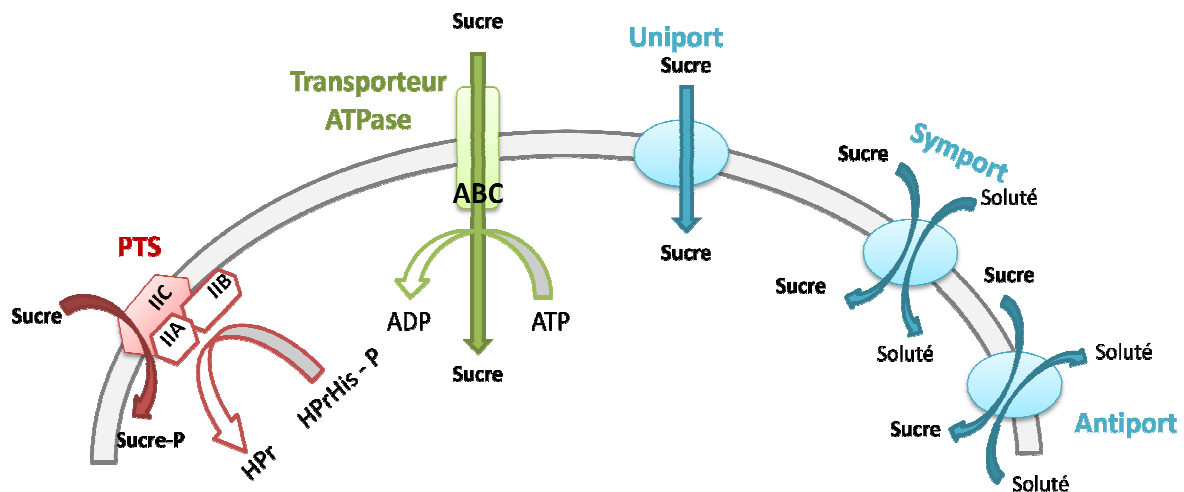


Figure 7: Représentation schématique de différents systèmes de transport de sucres

PTS : système de transport et de phosphorylation des sucres grâce aux enzymes IIABC (IIC : transport du sucre et IIA : phosphorylation du sucre) et l'enzyme HPr (transport du P) ;

Transporteur ATPase : contient une cassette ABC-Biding et couple la translocation du sucre à l'hydrolyse de l'ATP ;

Perméases uniport, symport antiport : canaux de transports qui permettent l'échange de sucres ou qui peuvent être liés à un transport d'ions.

Tableau 11 : Différents types de transporteurs de sucres chez *S. thermophilus*

(Hols *et al.*, 2005)

Type de transporteur	PTS	ABC	Perméase
Sucres	Fructose Sucrose	Glucose	Lactose Galactose

S. thermophilus en tant que bactérie lactique est la fermentation et la transformation rapide du lactose en lactate. Cinq sucres différents sont fermentés par *S. thermophilus*: le lactose, le saccharose, le glucose, le galactose et le fructose. *S. thermophilus* est très adaptée à croître sur lactose comme source de carbone. Le galactose et le fructose ne sont fermentés que par un nombre limité de souches (Vaillancourt *et al.*, 2002; Van den Bogaard *et al.*, 2004). La diversité des produits finaux de la fermentation est limitée. Outre le L-lactate, le produit de fermentation principal, de faibles niveaux de formate, acétoïne, diacétyle, l'acétaldéhyde et l'acétate ont été détectés comme complémentaires des produits finis (Ott *et al.*, 2000).

2.1 Transport des sucres

La première étape dans le métabolisme des sucres est leur transport à travers les enveloppes cellulaires. Les transporteurs de sucre sont généralement spécifiques du substrat et peuvent être divisés en trois catégories basées sur l'énergie utilisée pour le transport (Figure 7):

- les systèmes phosphotransférase (PTS) qui permettent la translocation des sucres par phosphorylation,
- les transporteurs ATPase qui contiennent une ATP-Binding Cassette (ABC),
- les perméases qui sont des canaux de transport par des mécanismes d'échanges liés ou non à des ions.

Le saccharose et le fructose sont les seuls sucres qui sont transportés par PTS chez *S. thermophilus*, mais avec une efficacité inférieure au lactose (Van den Bogaard *et al.*, 2004). Le tableau 11 spécifie le type de transporteur pour chaque sucre chez *S. thermophilus*.

Dans les génomes des deux souches LMG18311 et CNRZ1066 de *S. thermophilus*, 7 loci codent pour des systèmes PTS (*ptsG*, *fruA*, *bglP*, *treP*, *manLMN*, *celB*, *scrA*), 2 loci pour des transporteurs ABC de sucres (*malEF*, *stu/str0809-811*) et 2 loci pour des transporteurs de types perméase (*lacS*, *stu/str0855*) (Hols *et al.*, 2005). Les deux génomes contiennent aussi des pseudogènes pour le transport et l'utilisation d'autres sucres : ψ *ptsG* (PTS glucose), ψ *fruA* (PTS fructose), ψ *bglP* (β -glucosides PTS), ψ *treR* ψ *treP* ψ *treA* (PTS trehalose), ψ *scrR* *scrB* *scrA* *scrK* (PTS sucrose), *malQ* *malR* ψ *malE* ψ *malF* (transporteur ABC maltose/matodextrin). Le système PTS *manLMN* (transporteur PTS de mannose, fructose et

Tableau 12 : Systèmes codant pour le transport de sucres chez *S. thermophilus* LMD-9
(D'après Goh *et al.*, 2011)

Locus	Protéine codée	Homologue chez LMG18311	Homologue chez CNRZ1066
Systèmes de phosphotransferases (PTS)			
STER_0370	mannose/fructose PTS IID	stu0331	str0331
STER_0371	mannose/fructose PTS IIC	stu0332	str0332
STER_0372	mannose/fructose PTS IIAB	stu0333	str0333
STER_1323	Cellobiose PTS IIC	stu1368	str1368
STER_1710	Sucrose PTS EIIBCA	stu1734	str1734
ψSTER_0237	Glucose/N-acetylglucosamine PTS EIICBA, tronqué.	stu0189	str0189
ψSTER_0446	Fructose PTS IIA, tronqué.	stu0401	str0401
ψSTER_0544	Beta-glucoside PTS EIIBABC, tronqué.	stu0512	str0512
ψSTER_1862	Trehalose PTS EIIBABC, tronqué.	stu1890	str1890
ABC transporteur			
STER_0856	ABC transporteur	stu0808	str0808
STER_0857	SucreABC transporteur,	stu0809	str0809
STER_0858	Sucre ABC transporteur	stu0810	str0810
STER_0859	Sucre ABC transporteur	stu0811	str0811
STER_1153	ABC transporteur,	stu1188	str1188
STER_1154	Ribose/xylose/arabinose ABC transporteur	stu1189	str1189
STER_1155	ABC transporteur	stu1190	str1190
ψSTER_0249	Ribose/xylose/arabinose ABC transporteur, tronqué.	stu0201	str0201
Perméase			
STER_0891	Glucose/ribose perméase	stu0855	str0855
STER_1367	Lactose perméase, LacS	stu1398	str1398

glucose) semble intact. Toutefois une incapacité à transporter le glucose et le mannose a été démontrée (Cochu *et al.*, 2003). Trois autres transporteurs pourraient être capables d'acheminer le glucose : *celB* (PTS incomplet), *stu/str0855* de la famille des transporteurs *GRP* et *stu/str0809-811* un ABC transporteur.

La souche LMD-9 possède 5 loci codant pour des systèmes PTS (transport de mannose, de fructose, de cellobiose et de sucrose) et qui ont leurs homologues chez les deux souches LMG18311 et CNRZ1066. Elle possède aussi 7 loci codant pour des ABC transporteurs et 2 loci codant des perméases. Le génome de la souche LMD-9 possède aussi des pseudogènes codant pour le transport des sucres. Le tableau 12 présente ces différents systèmes prédits *in silico*.

Le niveau élevé de pseudogènes et la présence de gènes non fonctionnels dans le métabolisme des sucres illustrent clairement l'évolution régressive de *S. thermophilus* vers une adaptation spécialisée, dédiée à l'utilisation du lactose.

S. thermophilus transporte le lactose par la perméase LacS. LacS est une protéine membranaire qui fait partie de la famille des galactosides-pentoses-hexuronides (GPH) (Poolman *et al.*, 1996). La Figure 8 présente les différentes voies métaboliques induites suite à l'entrée du lactose. Une fois transporté dans la cellule, le lactose est hydrolysé en glucose et galactose par la β -galactosidase (LacZ). Le transporteur LacS fonctionne comme un antiport lactose /H⁺ et particulièrement lactose / galactose (Gunnewijk & Poolman, 2000; Hutkins & Ponne, 1991; Poolman *et al.*, 1990). Le galactose est le plus souvent exporté en échange de l'entrée du lactose. Le galactose peut être métabolisé par la voie de Leloir. Les quatre enzymes de la voie de Leloir permettent la transformation du galactose en glucose-1-phosphate, métabolite intermédiaire de la glycolyse. Toutes les souches utilisent le glucose issu de l'hydrolyse du lactose contrairement au galactose qui n'est pas métabolisé par toutes les souches et est généralement expulsé dans le milieu extérieur par LacS. Le glucose-1-phosphate est le précurseur des sucres nucléotidiques nécessaires à la biosynthèse des exopolysaccharides (EPS) et des rhamnose-polysaccharides (RPS). Toutefois, le glucose-1-phosphate, métabolite final de la voie de Leloir, peut être obtenu à partir du glucose-6-phosphate. Le glucose-6-phosphate est le précurseur de la glycolyse qui conduit à la formation du pyruvate. Le fructose-6-phosphate, issu de la première étape de la glycolyse, est le précurseur d'une voie de synthèse d'exopolysaccharides (EPS) et de la voie des pentoses-phosphates. La voie de la conversion du phosphoénol-pyruvate en oxo-glutarate

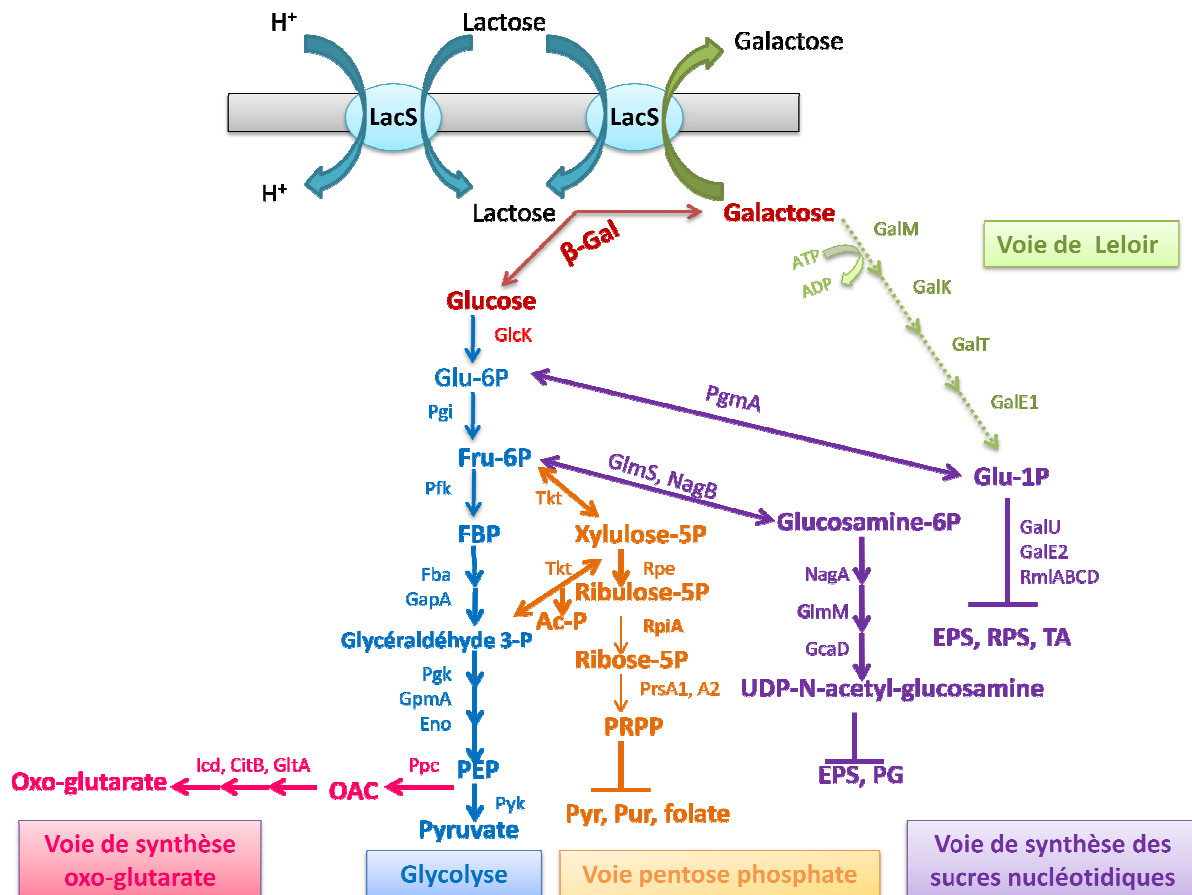


Figure 8: Voies de métabolisme du lactose chez *S. thermophilus* (D'après Hols *et al.*, 2005)

Glycolyse (bleu): Pgi (glucose 6-phosphate isomerase), Pfk (6-phosphofructokinase), Fba (fructose diphosphate aldolase), GapA (glyceraldehyde-3-P déshydrogénase), Pkg (phosphoglycerate kinase), GpmA (phosphoglycerate mutase), Eno (2-phosphoglycerate deshydratase enolase), Pyk (pyruvate kinase).

Voie pentose-phosphate (en orange): Tkt (transketolase), Rpe (ribulose-phosphate), RpiA (ribose-5-phosphate isomerase), PrsA1, A2 (ribose-phosphate pyrophosphokinase).

Voie de Leloir (en vert): GalM (aldose 1-épimérase), GalK (galactokinase), GalT (galactose 1-phosphate uridylyltransferase) et GalE1 (UDP-glucose 4-épimérase).

Biosynthèse d'oxo-glutarate (rouge): Ppc (phosphoenolpyruvate carboxylase), GltA (citrate synthase), CitB (aconitase hydratase), Icd (isocitrate deshydrogénase).

Biosynthèse des sucres nucleotidiques (mauve) : PgmA (phosphoglucomutase), GalU (UDPglucose pyrophosphorylase), GalE2 (UDP-glucose 4-épimérase), RmlA (glucose-1-phosphate thymidyl transferase), RmlB (dTDP-glucose-4,6-dehydratase), RmlC (dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-épimérase), RmlD (dTDP-4-keto- L-rhamnose reductase), GlmS (glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase), NagB (glucosamine-6-phosphate isomerase), NagA (N acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase), GlmM (phosphoglucoamine mutase), GcaD (UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase).

fait intervenir une phosphoenolpyruvate carboxylase, composé clé dans la biosynthèse de nombreux acides aminés (Figure 8).

2.2 Analyse et transcription des gènes du cluster gal-lac chez *S. thermophilus*

Les gènes codant pour l'utilisation du galactose et du lactose du cluster *gal-lac* de *S. thermophilus* sont disposés sur le chromosome dans l'ordre suivant : *galR* (régulateur de transcription), *galK* (galactokinase), *galT* (galactose-1-P uridylyltransferase), *galE* (UDP-glucose 4-épmérase), *galM* (galactose mutarotase), *lacS* (transporteur à lactose) et *lacZ* (β -galactosidase) avec *galR* orienté dans le sens opposé aux autres gènes (Figure 9). Les séquences et l'organisation de ces gènes sont hautement conservées entre les différentes souches de *S. thermophilus* (Van den Bogaard *et al.*, 2004). L'analyse des séquences montre la présence de quatre promoteurs potentiels en amont des gènes *galR*, *galK*, *galM* et *lacS*. Des séquences inversées forment des boucles en aval du gène *galE* et *lacZ* (Poolman *et al.*, 1990). La présence de ces promoteurs et de ces terminateurs suggère que *galK*, *galT* et *galE* constituent une unité transcriptionnelle et que *galM* est transcrit indépendamment. Les gènes *lacS* et *lacZ* forment un opéron et sont transcrits indépendamment de *galK*, *galT*, *galE* et *galM* (Vaillancourt *et al.*, 2002).

L'incapacité d'utiliser le galactose ne résulte pas d'un manque de support génétique puisque les gènes codant pour la voie de Leloir sont présents dans le génome de nombreuses souches incapables de métaboliser le galactose. En effet le gène *galE* est variablement transcrit chez plusieurs souches de *S. thermophilus* (Hutkins *et al.*, 1985b; Thomas & Crow, 1984; Van den Bogaard *et al.*, 2004). Après culture en M17 additionné de lactose de la souche *S. thermophilus* SMQ-301, les gènes de l'opéron *gal-lac* sont transcrits efficacement. En revanche, les gènes de l'opéron *gal* ne sont pas tous transcrits chez *S. thermophilus* CRNZ 302 (Vaughan *et al.*, 2001). *S. thermophilus* est donc incapable d'utiliser le galactose suite à la faible quantité de galactokinase ou bien à la faible induction du promoteur du gène *galK* (Van den Bogaard *et al.*, 2004). L'analyse de mutants spontanés Gal^+ et la complémentation par le gène *galK* de *S. salivarius* ont permis d'établir que la faible activité galactokinase est l'étape limitante majeure dans l'utilisation du galactose chez *S. thermophilus* (Vaillancourt *et al.*, 2004; Vaughan *et al.*, 2001).

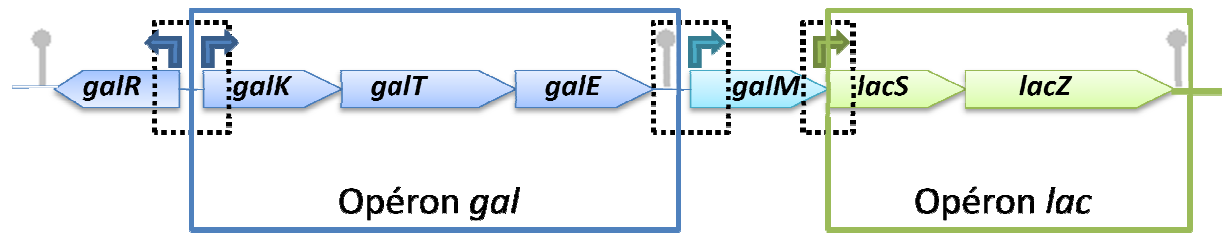


Figure 9: Organisation des gènes de l'opéron galactose et l'opéron lactose chez *S. thermophilus*

Opéron *gal* : *galR* (régulateur de transcription), *galK* (galactokinase), *galT* (galactose-1-P uridylyltransferase), *galE* (UDP-glucose 4-épmérase), *galM* (galactose mutarotase) ; Opéron *lac* : *lacS* (transporteur à lactose) et *lacZ* (β -galactosidase).

La transcription des gènes *lacS* et *lacZ* peut être induite par les sucres utilisés pour la croissance de *S. thermophilus* : après culture en M17 additionné de lactose, les gènes *lacS* et *lacZ* sont transcrits. Ces gènes sont moins transcrits lorsque la culture se fait en présence de saccharose (Vaillancourt *et al.*, 2002). D'autres études indiquent que *S. thermophilus* possède une activité de β -galactosidase plus importante après une croissance dans un milieu additionné de lactose que de glucose (Poolman *et al.*, 1990; Vaughan *et al.*, 2001)

2.3 Contrôle du métabolisme des sucres

La plupart des systèmes de transport de sucres sont soumis à une répression catabolique (RC), d'autres sont spécifiquement contrôlés par un régulateur propre. Chez les bactéries à Gram-positif à faible % G+C, la protéine de contrôle catabolite A (CcpA) est le régulateur central de la RC, et fait partie de la famille des protéines bactériennes régulatrices LacI-GalR (Van den Bogaard *et al.*, 2000).

La régulation du transport des sucres et le flux glycolytique mettent en jeu la phosphorylation de la protéine HPr ainsi que le régulateur de transcription CcpA (catabolite control protein). La protéine CcpA interagit avec une séquence d'ADN appelée *cre* (élément de répression catabolique) en présence de la protéine HPr phosphorylée sur la sérine 46 et de fructose-1,6-bisphosphate (FDP) (Hueck *et al.*, 1995; Stulke & Hillen, 2000; Weickert & Chambliss, 1990). Le complexe CcpA-HPr(ser)P est stabilisé par le FDP (Deutscher *et al.*, 1995) et se fixe sur les sites *cre* provoquant ainsi la répression, l'activation ou non de la transcription du gène. Chez *S. thermophilus*, le gène *lacS* est réprimé par CcpA (Gunnewijk & Poolman, 2000). CcpA contrôle le promoteur de *lacS* et joue un rôle clé dans l'ajustement des taux de transport du lactose et son hydrolyse. En plus de la régulation de *lacS* et *lacZ*, CcpA régule également les niveaux d'expression des trois enzymes clés de la glycolyse chez *S. thermophilus*. L'expression des gènes de la lactate déshydrogénase (*ldh*), la phosphofructokinase et la pyruvate kinase (l'opéron *pfk pyk*) semble être régulée par CcpA lorsque les bactéries sont cultivées en présence de lactose (Van den Bogaard *et al.*, 2000; Van den Bogaard *et al.*, 2004). Bien que la plupart des promoteurs soient soumis à la répression catabolique, il apparaît que le promoteur de *lacS* est sous le contrôle d'un activateur transcriptionnel GalR et est induit par le lactose (Vaughan *et al.*, 2001). L'expression des gènes de l'opéron lactose est induite quand les cellules poussent dans un

Tableau 13: Comparaison des gènes impliqués dans le métabolisme du carbone chez des streptocoques (Bolotin *et al.*, 2004)

Type du transporteur	PTS	ABC	Perméase
<i>S. thermophilus</i> LMG18311	5	4	1
<i>S. pneumoniae</i> TIGR4	50	15	0
<i>S. agalactiae</i> 2603 V/R	29	15	0
<i>S. mutans</i> UA159	20	13	0

milieu contenant du glucose ou du galactose. En particulier la transcription de l'opéron *lacSZ* est activée par l'activateur GalR (Vaughan *et al.*, 2001). Ce régulateur est d'un intérêt particulier puisque, contrairement aux autres systèmes, il ne se trouve pas sur les nombreuses copies de plasmides, mais inséré dans le chromosome (Luesink *et al.*, 1999). Ainsi, plusieurs niveaux de régulation du transport du lactose chez *S. thermophilus* existent : d'une part une régulation transcriptionnelle modulée entre autres par la protéine CcpA et d'autre part par GalR.

2.4 Conclusion

Le génome de *S. thermophilus* s'est adapté à son environnement par une évolution réductive mais cela n'a pas été observé chez *Lactococcus lactis* (seulement 6% de pseudogènes) (Makarova *et al.*, 2006b; Schroeter & Klaenhammer, 2009). Le métabolisme des sucres chez *S. thermophilus* semble particulièrement touché par cette évolution. Le tableau 13 montre l'importante perte de gènes impliqués dans le transport des sucres chez différents streptocoques.

Ainsi, les études portant sur le métabolisme des sucres chez *S. thermophilus* montrent la prédominance des pseudogènes et la spécialisation de cette bactérie vers l'utilisation du lactose. Néanmoins, ces études sont réalisées *in vitro* et peu de données sont disponibles sur le devenir de cette voie métabolique chez *S. thermophilus in vivo*.

Chapitre 3 : Interactions *S. thermophilus* et système digestif de l'hôte

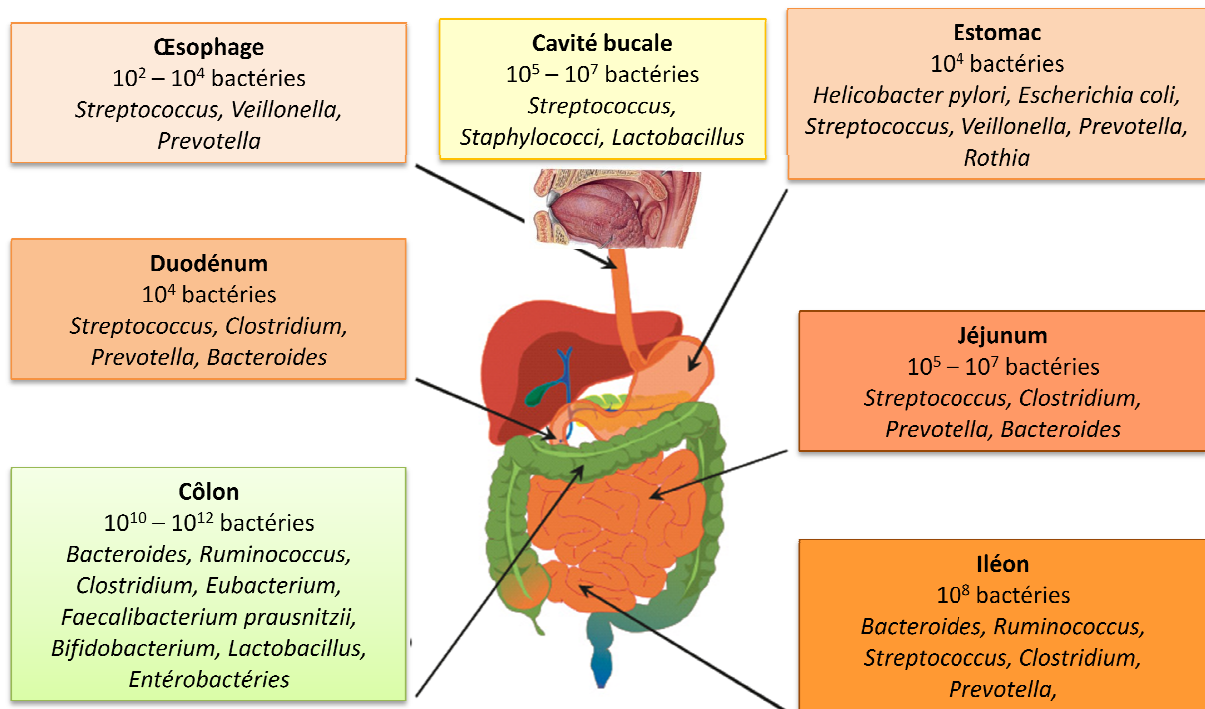


Figure 10: Schéma du tractus gastro-intestinal et répartition des espèces majoritaires (D'après Coudeyras & Forestier, 2010).

Etant essentiellement utilisé en fermentation alimentaire ou en tant que probiotique en association avec d'autres bactéries, *S. thermophilus* entre en interaction avec l'hôte et son microbiote au niveau du tractus digestif après ingestion du produit fermenté. Aussi, je présenterai ici la structure du système digestif, puis l'évolution de l'installation du microbiote chez l'Homme avec un intérêt particulier pour *S. thermophilus* et enfin je ferai une synthèse des études portant sur les effets de *S. thermophilus* sur l'hôte.

1 Hôte : structure du système digestif de l'Homme

Le tractus digestif (TD) est composé de 5 parties successives : la cavité buccale, l'estomac, l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon), le caecum et le côlon (côlon ascendant, côlon transversal et côlon descendant) (Figure 10). Chaque partie est caractérisée par des conditions différentes :

- l'œsophage : population microbienne la plus faible et péristaltisme vers l'estomac.
- l'estomac : pH très acide et présence d'enzymes gastriques et de mucus.
- l'intestin grêle : péristaltisme important et présence de mucus. Le contenu stomacal est neutralisé dans le duodénum grâce aux sécrétions pancréatiques. La quantité d'oxygène diminue en progressant dans l'intestin, si bien que l'anaérobiose est atteinte dans sa partie distale.
- le colon : anaérobiose, stase (ralentissement du transit) et présence de mucus.

L'intestin grêle et le colon présentent une grande surface d'échange entre l'hôte et les aliments ingérés et permettent l'absorption des nutriments. Ils hébergent la plus grande charge microbienne au niveau de la lumière intestinale. Les parois de l'intestin grêle sont recouvertes de plis circulaires, de villosités et de microvillosités formant la bordure en brosse, ce qui lui confère une surface d'échange avec la lumière de 400 m² en moyenne. Les sécrétions intestinales permettent de maintenir un pH neutre ou légèrement basique aux alentours de 8. L'intestin grêle est le siège de phénomènes d'absorption mais joue également un rôle dans les phénomènes de sécrétion et participe à la réponse immunitaire. Dans le colon, le pH est compris entre 4,7 et 7,5 dans sa partie proximale et distale respectivement. L'épithélium est constitué de colonocytes, cellules responsables de

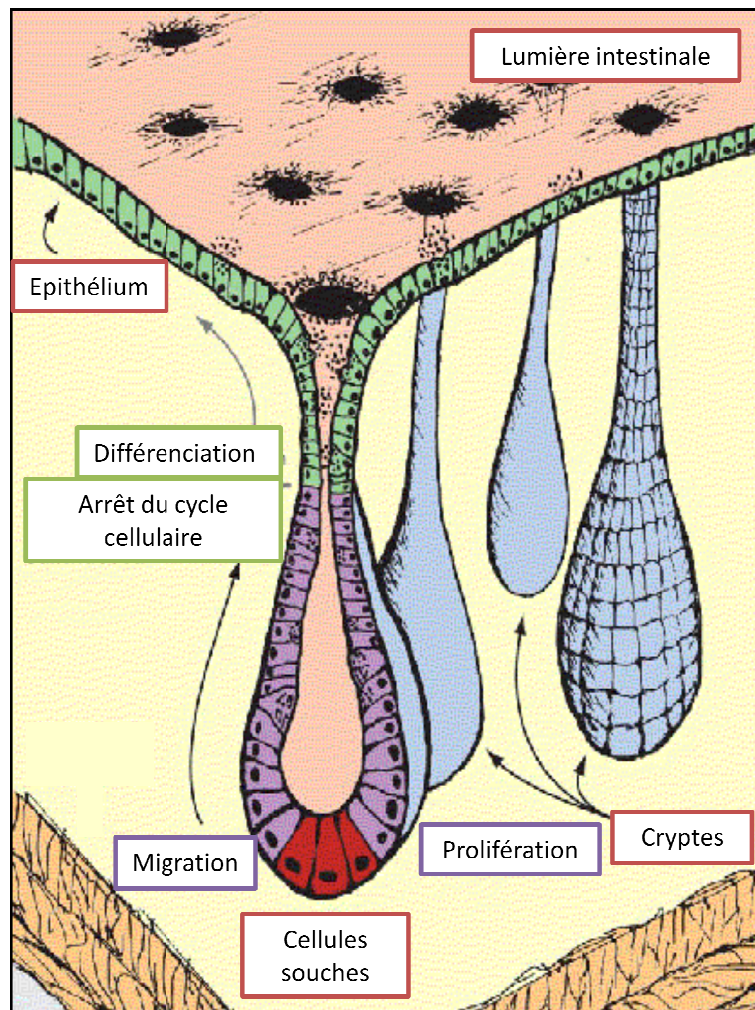


Figure 11 : Représentation schématique de cryptes coliques (D'après Sancho *et al.*, 2004)

l'absorption de l'eau et des électrolytes, de cellules caliciformes et de cellules entéroendocrines.

Le TD représente la plus grande surface d'échange de notre corps et héberge une communauté bactérienne dense et complexe avec plus de 1000 espèces par individu (Qin *et al.*, 2010). Le microbiote du TD est constitué de bactéries appartenant principalement à 6 phyla bactériens: *Firmicutes*, *Bacteroides*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* et TM7 (Tap *et al.*, 2009). Le degré de colonisation augmente tout au long du tractus : de l'œsophage au côlon distal qui peut renfermer jusqu'à 10^{12} bactéries/g de contenu. La majorité des bactéries associées à la muqueuse sont anaérobies strictes (Joly *et al.*, 2010). L'espèce *Streptococcus* est détectée dans toutes les parties du tractus gastro-intestinal.

Le microbiote a un effet trophique sur les tissus de l'hôte, notamment en leur fournissant des éléments assimilables comme les acides gras à chaîne courte. Il module l'expression génique des cellules de l'hôte et stimule ainsi la prolifération des entérocytes, l'absorption et le métabolisme des nutriments, la captation de certains ions comme le fer, le magnésium ou le calcium, et améliore la fonction de barrière de l'épithélium (Hooper *et al.*, 2001). Il est bien établi que certaines bactéries pathogènes modifient le cycle de la cellule hôte (Nougayrede *et al.*, 2005); néanmoins le microbiote intestinal peut lui aussi moduler le cycle cellulaire par des voies similaires à celles des bactéries pathogènes (Cherbuy *et al.*, 2010). Ainsi, le microbiote est un acteur majeur dans la modélisation de la structure des cellules eucaryotes qui forme la monocouche la plus externe de la muqueuse intestinale (Figure 11). L'épithélium est l'une des structures les plus dynamiques dans tout l'organisme car elle s'auto-renouvelle chaque 36 à 96 heures (Falk *et al.*, 1998). Ce renouvellement est soutenu par les cellules souches épithéliales qui migrent du bas vers le haut des cryptes en passant par des phases de prolifération, différenciation et de maturation avant d'être exfoliées dans la lumière intestinale.

2 Evolution du microbiote de l'enfant à l'adulte

Les processus impliqués dans la colonisation intestinale et l'établissement de populations microbiennes sont complexes et impliquent la succession de populations microbiennes, des interactions avec l'hôte et des facteurs extérieurs (Figure 12).

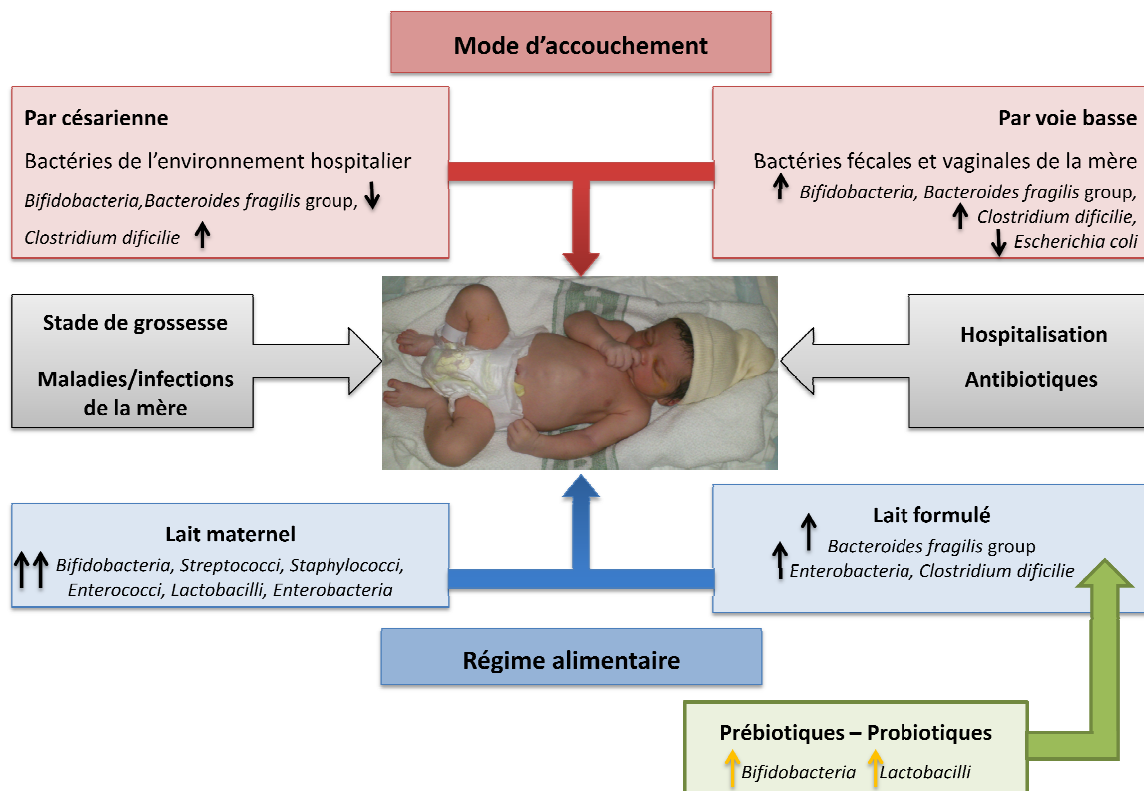


Figure 12: Facteurs affectant la colonisation et la composition du microbiote de l'enfant
(D'après Marques *et al.*, 2010)

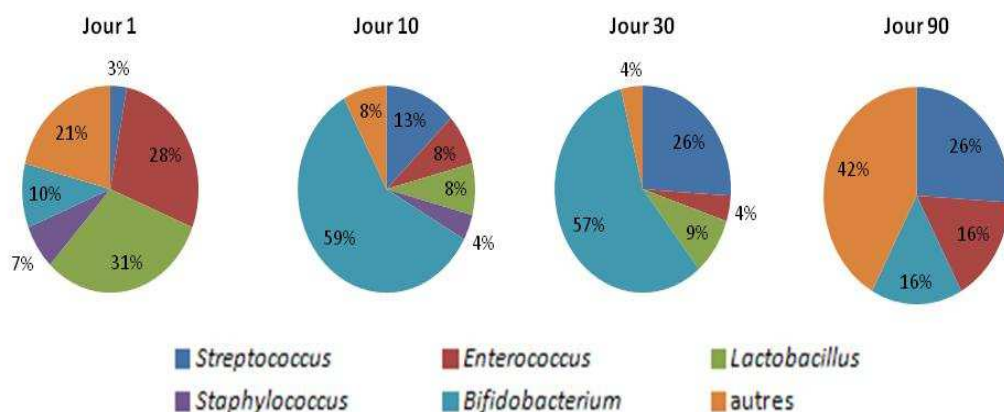


Figure 13: Pourcentage des différents genres bactérien établis chez les nouveaux-nés nourris avec du lait maternel (D'après Solis *et al.*, 2010)

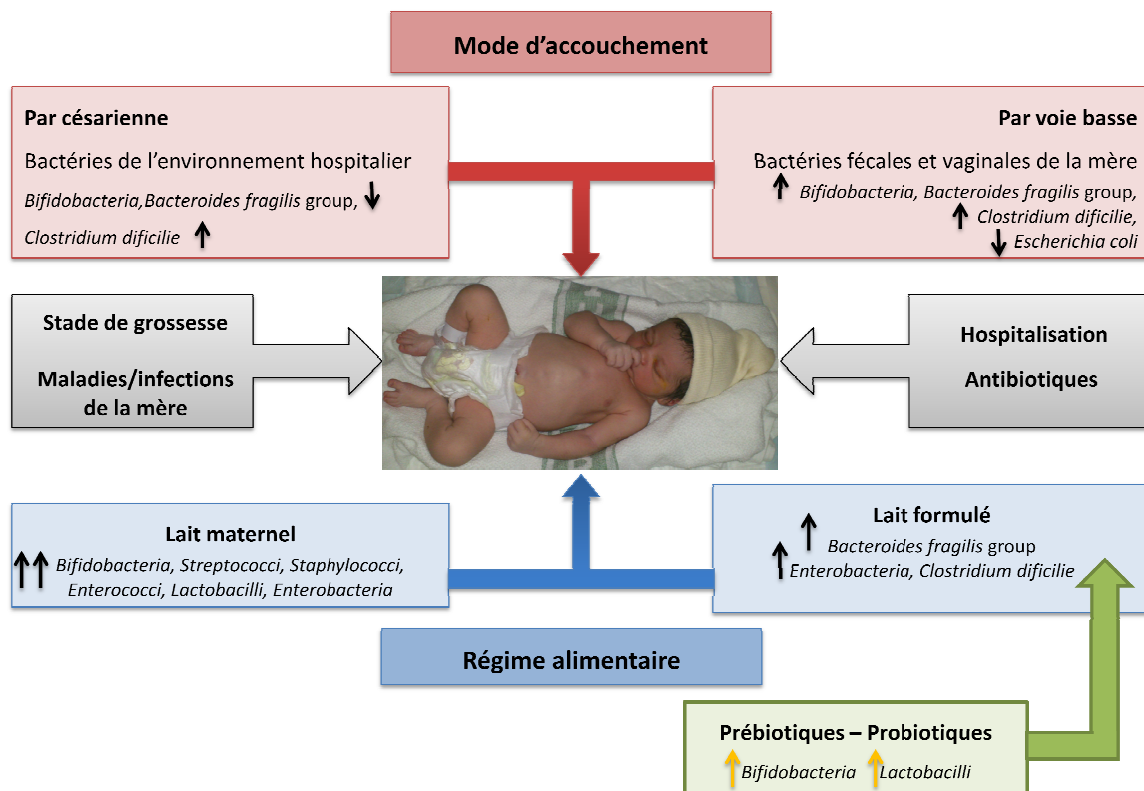


Figure 12: Facteurs affectant la colonisation et la composition du microbiote de l'enfant
(D'après Marques *et al.*, 2010)

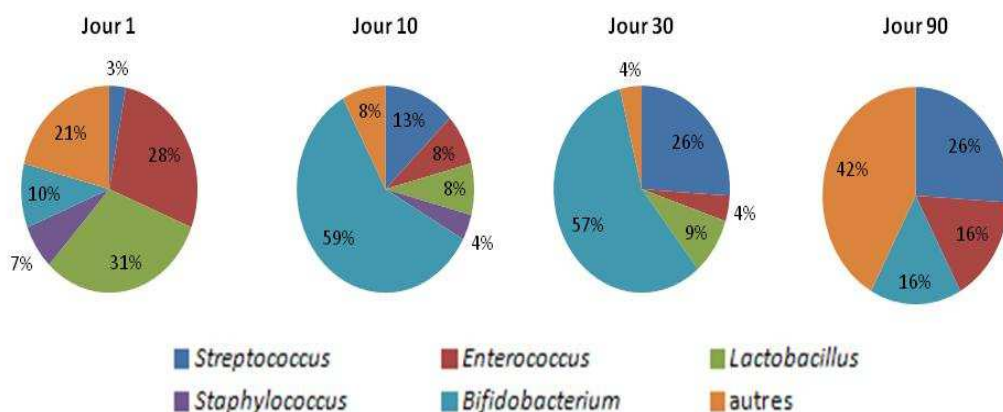


Figure 13: Pourcentage des différents genres bactérien établis chez les nouveaux-nés nourris avec du lait maternel (D'après Solis *et al.*, 2010)

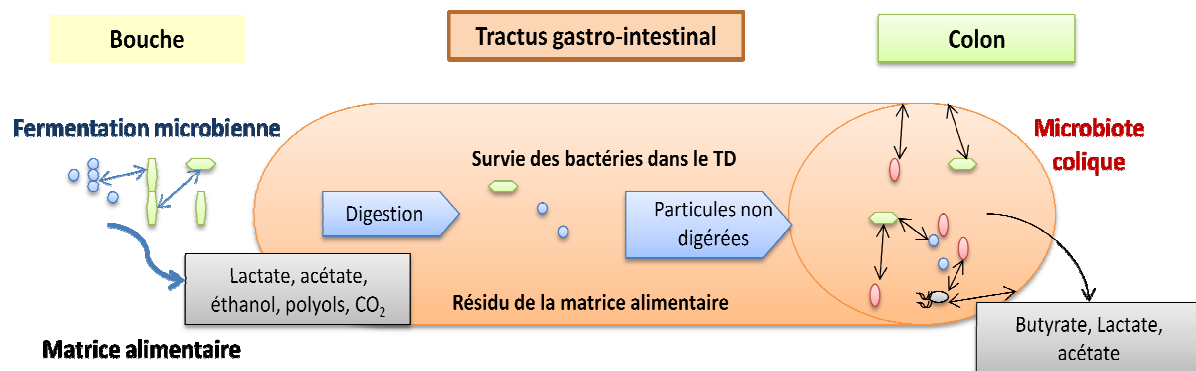
A la naissance, le TD des nouveaux nés est stérile (DiGiulio *et al.*, 2008; Jiménez *et al.*, 2008). Toutefois, pendant et après le processus de la naissance, les bébés sont exposés à des bactéries qui proviennent de la mère et du milieu environnant (Gueimonde *et al.*, 2006; Vaishampayan *et al.*, 2010). Penders et ses collaborateurs montrent dans une étude sur 1032 nouveaux nés âgés de 1 mois l'importance du stade de grossesse, du mode d'accouchement, du régime alimentaire, de l'hospitalisation et de l'utilisation des antibiotiques dans la détermination de la composition du microbiote chez les nouveaux nés. Les nouveau-nés qui sont nés par voie vaginale à la maison et nourris exclusivement au sein présentent un microbiote plus « bénéfique » (avec les nombres les plus élevés de bifidobacteria et les plus bas de *C. difficile* et de *E. coli*) (Penders *et al.*, 2006). Juste après la naissance, le TD des nouveaux nés est colonisé par des bactéries anaérobies facultatives telles que des *Enterobacteriaceae*, des *Streptococci* et des *Staphylococci* (Penders *et al.*, 2006; Solis *et al.*, 2010). Ces bactéries consomment l'oxygène et préparent le TD à la colonisation par des bactéries anaérobies strictes telles *Bifidobacteria*, *Clostridium* et *Bacteroides* (Fanaro *et al.*, 2003; Mackie *et al.*, 1999; Penders *et al.*, 2006).

Le genre *Streptococcus* est détecté dans le lait maternel qui lui permet donc d'être apporté de manière relativement constante dans le TD (Perez *et al.*, 2007; Solis *et al.*, 2010). La Figure 13 montre l'établissement de différents genres bactériens isolés à partir de fèces de nouveaux nés nourris avec du lait maternel à différents temps.

Avec l'introduction de l'alimentation diversifiée le microbiote des enfants évolue et tend à ressembler à celui des adultes avec la co-domination de plus en plus marquée des *Bacteroidetes* et des *Firmicutes* (Koenig *et al.*, 2010). Toutefois, même s'il n'est pas dominant (Tap *et al.*, 2009) le groupe des *streptococci* est détecté dans les échantillons de fèces de la majorité d'individus européens testés (Qin *et al.*, 2010).

3 Effets de *S. thermophilus* sur l'hôte

Les aliments fermentés représentent approximativement 1/3 de l'alimentation humaine (Campbell-Platt 1994). La fermentation des composants alimentaires par des micro-organismes se produit au cours de certains procédés de production alimentaire et dans le TD. Au cours de ces transformations, des composés spécifiques sont produits qui proviennent de réactions de biotransformation ou de biosynthèse, et qui peuvent affecter la



	Aliments fermentés	Fermentation colique
Micro-organismes dominants Consortium Interactions	• Champignons, levures, bactéries lactiques • Complexité faible à modérée • Mico-organisme - Mico-organisme / Mico-organisme - substrat	• <i>Bacteroidetes</i> et <i>Firmicutes</i> • Complexité élevée • Réseaux complexes: substrats – micro-organismes-hôte
Molécules à effets Métabolites Composés issus de la biosynthèse et la biotransformation Constituants cellulaires	• Lactate, acétate, éthanol, polyols, CO₂ • Vitamines, anti-oxydants	• Acides gras à chaîne courte, composés gazeux • Vitamines, antioxydants, acides aminés • Lipo-polysaccharides, peptidoglycane, flagelline
Possibilité de moduler le microbiote Connaissance des mécanismes Facteurs de modulation	• Moyenne à élevée • Cultures, substrats, processus	• Faible à moyenne • Principaux composants alimentaires, pré/probiotiques

Figure 14 : Représentation de la continuité de la fermentation de l'aliment au TD (D'après van Hylckama Vlieg *et al.*, 2010)

santé du consommateur. La Figure 14 montre comment les aliments fermentés peuvent agir sur l'hôte.

Malgré la large utilisation de *S. thermophilus* en industrie alimentaire, dans la fermentation des produits laitiers et plus particulièrement dans le yaourt, peu d'études portent sur son effet sur l'hôte (hormis les études sur l'intolérance au lactose). Le Tableau 14 synthétise les études effectuées sur les effets sur l'hôte de *S. thermophilus* seul ou lorsqu'il est associé à d'autres bactéries. Les études ont été réalisées chez l'homme et l'animal. *S. thermophilus* entre dans la composition de certains probiotiques tel que le VSL#3 dont les effets ont été étudiés. Ce tableau montre le nombre réduit d'études effectuées sur *S. thermophilus* dans le TD. La majorité de ces études traitent de pathologies au niveau intestinal. *S. thermophilus* semble prévenir les inflammations et les colites, mais les mécanismes d'action de cette bactérie seule ou combinée avec d'autres bactéries lactiques ne sont pas bien connus. *S. thermophilus* a des effets semblables à ceux du yaourt. Une meilleure connaissance de *S. thermophilus* dans le TD permettrait de mieux cerner ses effets sur l'hôte ainsi que les mécanismes d'action impliqués et d'identifier les molécules qui en sont responsables.

Tableau 14: Effets de *S. thermophilus* seul ou en association avec d'autres bactéries sur l'hôte

	Bactéries/matrice	Effets	Références
<i>S. thermophilus</i>	Lait fermenté avec <i>S. thermophilus</i> DN-001 158	Inhibition d'agent carcinogène à 93% chez des rats F344	(Tavan <i>et al.</i> , 2002)
	Lait fermenté avec <i>S. thermophilus</i> CRL 1190 et <i>S. thermophilus</i> CRL 804	Réduction de la colite induite chez des souris BALB/c	(Rodriguez <i>et al.</i> , 2009)
	<i>S. thermophilus</i> TH-4	Pas de prévention contre la colite induite par le DSS chez des rats	(Geier <i>et al.</i> , 2007)
	<i>S. thermophilus</i> TH-4	Diminution des irritations de l'intestin grêle de rates « Dark Agouti »	Tooley 2006
VSL#3	<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Bifidobacterium infantis</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Prévient des pouchites aiguës chez les patients (augmentation de <i>S. thermophilus</i> dans le TD)	(Gionchetti <i>et al.</i> , 2003)
		Les bactéries colonisent le TD et stabilisent les patients atteints de colite ulcéreuse en rémission	(Venturi <i>et al.</i> , 1999)
		Prévient l'apparition d'iléite des souris SAMP	(Pagnini <i>et al.</i> , 2009)
Mix bactérien	Formule supplémentée avec <i>Bifidobacterium bifidum</i> et <i>S. thermophilus</i>	prévention de la diarrhée chez les jeunes enfants (âgés de 5 à 24 mois)	(Saavedra <i>et al.</i> , 1994)
	Mix: <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , and <i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i>	Prévention de colite induite par le TNBS chez des souris BALB/c	(Roselli <i>et al.</i> , 2009)

RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 1 : Physiologie de *S. thermophilus* dans le tractus digestif d'animaux
modèles et effet sur l'hôte

1 Introduction

S. thermophilus est un ferment d'une importance majeure dans l'industrie laitière. Cette bactérie lactique thermophile est utilisée pour la production de yaourts, de laits fermentés et de nombreux fromages à pâte cuite tels que l'Emmental et le Comté, ou des fromages à pâtes non cuites tels que le Cantal et le Cheddar et des fromages frais.

En France, la production des yaourts et des laits fermentés a augmenté de 1582358 tonnes en 2009 à 1607318 tonnes en 2010. La production des fromages a aussi augmenté de 1745207 tonnes en 2009 à 1831484 tonnes en 2010 (L'économie laitière en chiffres, 2011). L'arrivée sur les marchés d'une grande variété de produits laitiers et une prise de conscience de leurs effets bénéfiques sur la santé ont joué un rôle majeur dans l'augmentation régulière de la consommation des produits laitiers de 1995 à 2009 (+21,7%) (CREDOC/CNIEL, 2010). L'augmentation de la consommation de produits laitiers va de pair avec l'augmentation de consommation de bactéries lactiques.

La sélection des souches de bactéries lactiques utilisées en industrie se fait selon des critères distincts. Ainsi, différents aspects du métabolisme de *S. thermophilus* ont été étudiés : la vitesse d'acidification et la production de lactate (Acuña *et al.*, 1994; Oliveira *et al.*, 2009), la production d'arômes (Monnet & Corrieu, 2007) et la texture du produit fermenté (De Vuyst *et al.*, 2002). Des analyses transcriptomiques et protéomiques ont été réalisées afin d'étudier la physiologie des souches de *S. thermophilus* et leur adaptation à différents milieux (Courtin *et al.*, 2002; Derzelle *et al.*, 2005; Herve-Jimenez *et al.*, 2008; Sieuwerts *et al.*, 2010). L'ensemble de ces études a permis une meilleure connaissance de la physiologie de *S. thermophilus in vitro* qui pourrait être exploitée en vue d'une amélioration de la qualité organoleptique des différents produits laitiers.

Même si de nombreuses études ont porté sur les bactéries lactiques *in vitro*, la physiologie de ces bactéries une fois ingérées est peu connue. Qu'en est-il de *S. thermophilus* une fois dans le tractus digestif ?

Dans le premier chapitre de ce manuscrit, nous nous sommes intéressés à l'étude du métabolisme de *S. thermophilus* dans le tractus digestif et l'impact que pourrait avoir cette bactérie sur l'épithélium de l'hôte. Cette étude fait l'objet d'un article présenté dans la suite ainsi que des résultats complémentaires.

2 Article

Impact de l'activité métabolique de *Streptococcus thermophilus* sur l'épithélium colique de rats gnotobiotiques

2.1 Contexte et objectifs

Un défi majeur dans le domaine de la métagénomique est d'identifier les espèces bactériennes, les associations des gènes bactériens et les phénotypes qui agissent pour moduler les populations microbiennes et ce afin d'améliorer la santé humaine. Le projet MetaHIT aborde ce défi en développant et en intégrant un certain nombre d'approches à haut débit. Dans le cadre de ce projet, des espèces présentant 90% de similitudes au niveau des séquences avec *S. thermophilus* ont été détectées chez 124 européens (Qin *et al.*, 2010). Même si le genre *Streptococcus* est détecté dans les fèces de nouveau né (Perez *et al.*, 2007; Solis *et al.*, 2010), une étude sur la phylogénie du microbiote humain a démontré que *S. thermophilus* n'appartient pas aux groupes de bactéries dominantes qui constituent le microbiote (Tap *et al.*, 2009). Néanmoins la consommation régulière de produits laitiers ou de probiotiques permet un apport constant de *S. thermophilus* dans le TD.

L'objectif de ce travail est d'étudier le métabolisme de *S. thermophilus* dans le TD chez des rats gnotobiotiques sur une période de quatre semaines.

Afin d'explorer l'activité métabolique de *S. thermophilus in vivo* et la réponse de l'hôte suite à l'arrivée de cette bactérie, nous avons :

- i) suivi la colonisation du tractus digestif de rats gnotobiotiques par deux souches : *S. thermophilus* LMD-9 et *S. thermophilus* LMG18311;
- ii) établi le profil protéique de *S. thermophilus* LMD-9 après son passage et sa survie dans le TD de rats mono-associés ;
- iii) étudié l'effet de *S. thermophilus* LMD-9 et *S. thermophilus* LMG18311 sur l'épithélium colique et plus particulièrement sur les transporteurs de mono-carboxylates et sur les protéines du cycle cellulaire.

2.2 Méthodes

Des rats axéniques ont été inoculés (un seul gavage) avec du lait fermenté avec *S. thermophilus* (5×10^8 UFC/mL). L'implantation de cette bactérie a été suivie par dénombrement sur milieu gélosé pendant quatre semaines. Après passage dans le TD des rats, les protéines associées aux enveloppes bactériennes de *S. thermophilus* ont été extraites et identifiées par LC-MS/MS. Par une analyse protéomique comparative bidimensionnelle, nous avons comparé les protéines cytoplasmiques de *S. thermophilus*, après croissance en lait et après passage dans le TD. Le lactate, métabolite produit par la bactérie, a été dosé dans le contenu caecal et les fèces des rats.

L'étude de l'effet de *S. thermophilus* sur l'hôte a porté sur les cellules épithéliales coliques. Nous avons regardé l'aspect de cet épithélium colique et plus particulièrement la profondeur des cryptes sur des coupes histologiques. Nous avons ensuite déterminé l'expression des transporteurs de mono-carboxylates SLC16A1, SLC16A2 et SLC5A8 par RT-qPCR ainsi que les protéines d'arrêt du cycle cellulaires p21^{cip1} et p27^{kip1} par Western blot.

2.3 Principaux résultats

- *S. thermophilus* LMD-9 et LMG18311 s'adaptent au TD et le colonisent (10^8 UFC/g de fèces) après 4 semaines. La colonisation est progressive. Elle débute par une phase d'adaptation sur les deux premières semaines, une phase de croissance à partir de la deuxième semaine et une phase de maintien à partir de la troisième semaine.
- La comparaison des profils protéiques de *S. thermophilus* LMD-9 après croissance dans le lait et après passage dans le TD montre une différence d'abondance de certaines protéines. Après passage dans le tractus digestif, 11 protéines sont induites dont 8 impliquées dans le métabolisme du carbone. Les protéines réprimées sont impliquées dans des fonctions cellulaires de base.
- *S. thermophilus* LMD-9 et LMG18311 sont métaboliquement actifs dans le TD et induisent une glycolyse massive qui conduit respectivement à la production de 13.6 mM et de 10.2 mM de L-lactate dans le contenu caecal.
- Au niveau de l'épithélium colique, les ARNs messagers codant les transporteurs de mono-carboxylates SLC16a1 et SLC5a8 sont induits chez des rats mono-associés avec *S. thermophilus* LMD-9 (Ino –LMD9) par rapport à des rats axéniques (les facteurs d'induction étant respectivement de 2.2 et 1.7). La colonisation par *S. thermophilus* LMD-9 n'a pas

d'effet sur la morphologie des cryptes mais elle induit la production de la protéine d'arrêt du cycle cellulaire p27^{kip1} d'un facteur de 1.8 chez les rats Ino-LMD9 en comparaison avec des rats axéniques.

Le lactate pourrait être la molécule « signal » qui induit la production de la protéine d'arrêt du cycle cellulaire p27^{kip1}. Cette hypothèse est confortée par les résultats d'expériences *in vitro* et d'expériences *in vivo* suivants :

- des co-incubations de cellules HT29 avec 20mM ou 50mM de lactate conduisent à l'induction de la protéine d'arrêt du cycle cellulaire p27^{kip1}.
- la construction de modèles de rats monoassociés avec deux souches productrices de lactate (*S. thermophilus* LMD9 et *S. thermophilus* LMG18311) a permis d'observer une induction de la protéine d'arrêt du cycle cellulaire p27^{kip1}. Contrairement à cela, dans les modèles de rats monoassociés avec deux bactéries non productrices de lactate (*Bacteroides thetaiotaomicron* et *Ruminococcus gnavus*) aucune induction de la protéine d'arrêt du cycle cellulaire p27^{kip1} n'est observée.

2.4 Conclusion

La caractérisation du métabolisme de *S. thermophilus* dans le tractus de rats gnotobiotiques a permis en premier lieu de constater que cette bactérie est métaboliquement active *in vivo* et en deuxième lieu de mettre en évidence l'intensification de son métabolisme glycolytique. Cette induction massive des protéines impliquées dans la glycolyse conduit à la production de L-lactate dans la lumière intestinale. La colonisation de *S. thermophilus* s'accompagne d'une induction des transporteurs de mono-carboxylates et la protéine d'arrêt du cycle cellulaire p27^{kip1}. L'hypothèse avancée dans ce travail est que lactate produit *in vivo* par *S. thermophilus* est la molécule « signal » impliquée dans la réponse de l'hôte.

2.5 Participation à la réalisation de cette étude

Plusieurs résultats présentés dans l'article étaient produits avant mon arrivée, cependant j'ai participé au travail afin de mieux comprendre « l'effet » lactate.

J'ai contribué à l'étude de la réponse de l'hôte à la colonisation du TD par *S. thermophilus*. Plus précisément, j'ai comparé l'induction des transporteurs de mono-carboxylates (SLC16a1, SLC16a2 et SLC5a8) au niveau des cellules épithéliales coliques entre rats axéniques et rats mono-associés avec *S. thermophilus* par RT-PCR quantitative.

Ensuite, j'ai étudié l'effet de l'accumulation du lactate dans le colon chez des rats axéniques. D'une part, nous nous sommes posé la question de savoir si un apport exogène de lactate à des rats axéniques avait le même effet sur l'épithélium colique que le lactate produit par *S. thermophilus*. Ainsi, j'ai ajouté du lactate dans l'eau de boisson des rats axéniques pour assurer un apport régulier de lactate (concentration finale 50mM). Toutefois, je n'ai pas détecté de lactate dans les fèces ; celui-ci est probablement absorbé en totalité au niveau du TD.

D'autre part et afin de démontrer le rôle du lactate produit par *S. thermophilus* dans le TD, j'ai essayé d'invalider le gène codant la lactose déshydrogénase (Ldh) de *S. thermophilus* LMD-9. Je n'ai pas réussi à obtenir ce mutant car cette mutation est probablement létale (détails présentés dans les résultats complémentaires).

Impact of the Metabolic Activity of *Streptococcus thermophilus* on the Colon Epithelium of Gnotobiotic Rats^{*[S]}

Received for publication, July 26, 2010, and in revised form, January 11, 2011. Published, JBC Papers in Press, January 14, 2011, DOI 10.1074/jbc.M110.168666

Françoise Rul¹, Leila Ben-Yahia, Fatima Chegdani, Laura Wrzosek, Stéphane Thomas, Marie-Louise Noordine, Christophe Gitton, Claire Cherbuy, Philippe Langella, and Muriel Thomas²

From the INRA, MICALIS (UMR 1319), Domaine de Vilvert, F-78352 Jouy-en-Josas, France

The thermophilic lactic acid bacterium *Streptococcus thermophilus* is widely and traditionally used in the dairy industry. Despite the vast level of consumption of *S. thermophilus* through yogurt or probiotic functional food, very few data are available about its physiology in the gastrointestinal tract (GIT). The objective of the present work was to explore both the metabolic activity and host response of *S. thermophilus* *in vivo*. Our study profiles the protein expression of *S. thermophilus* after its adaptation to the GIT of gnotobiotic rats and describes the impact of *S. thermophilus* colonization on the colonic epithelium. *S. thermophilus* colonized progressively the GIT of germ-free rats to reach a stable population in 30 days (10^8 cfu/g of feces). This progressive colonization suggested that *S. thermophilus* undergoes an adaptation process within GIT. Indeed, we showed that the main response of *S. thermophilus* in the rat's GIT was the massive induction of the glycolysis pathway, leading to formation of lactate in the cecum. At the level of the colonic epithelium, the abundance of monocarboxylic acid transporter mRNAs (SLC16A1 and SLC5A8) and a protein involved in the cell cycle arrest (p27^{kip1}) increased in the presence of *S. thermophilus* compared with germ-free rats. Based on different mono-associated rats harboring two different strains of *S. thermophilus* (LMD-9 or LMG18311) or weak lactate-producing commensal bacteria (*Bacteroides thetaiotaomicron* and *Ruminococcus gnavus*), we propose that lactate could be a signal produced by *S. thermophilus* and modulating the colon epithelium.

Streptococcus thermophilus belongs to the group of the thermophilic lactic acid bacteria and is traditionally and widely used as a starter in manufacturing dairy products (Emmental, Gruyère, Parmigiano, mozzarella, yogurt, etc.). Yogurt, which results from the fermentation of milk by *S. thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* (*L. bulgaricus*), fulfills the current specifications required to be recognized as a probiotic product (1). The health beneficial effect of yogurt consumption is linked to the metabolic properties of *S. thermophilus* and *L. bulgaricus*. As such, it improves lactose digestion in the gas-

trointestinal tract (GIT)³ through their lactose-hydrolyzing activity present in yogurt and in the GIT, thus reducing symptoms of lactose intolerance (2, 3).

Yogurt cultures have been shown to induce other health benefits, such as reduction of diarrhea or allergic disorders as well as modulation of the immune system (1, 4). *S. thermophilus* is also present at high concentration in VSL#3, a probiotic mixture of eight different bacterial strains that possesses beneficial effects in several intestinal conditions (5, 6).

Recent data indicate that strains related to *S. thermophilus* LMD-9 are among the 57 bacteria species found in the intestinal microbiota of 90% of 124 European individuals (7). In comparison with the overall human intestinal microbiota, *S. thermophilus* is a numerically nondominant species with variable levels (7–10). At birth, the *Streptococcus* genus, with in some studies a precision at the level of *S. thermophilus* species, is among the first colonizers of the GIT because it has been detected in infant feces and breast milk (11–13). Thus, *Streptococcus*, as pioneer bacteria colonizing a yet immature GIT, may impact the maturation and homeostasis of the intestinal epithelium after birth.

Convergent data show that intestinal bacteria modulate proliferation and differentiation processes of the intestinal epithelium (14–16), which is one of the most dynamic tissues of the whole organism. Moreover, we have recently demonstrated that microbiota increases colonic epithelium crypt depth in concordance with a well orchestrated modulation of the level of proteins involved in life cycle steps like PCNA, Bcl2, and p21^{cip1}, p27^{kip1} (markers of proliferation, antiapoptotic pathway, and cell cycle arrest, respectively) (17). Despite its large utilization and consumption, its probiotic-associated traits, and its presence in the intestinal microbiota, the role of *S. thermophilus* in the gut is still largely unknown. A previous study (18) showed that, in mono-associated animals, *S. thermophilus* produced an active β -galactosidase in the GIT, which is responsible for lactose hydrolysis. Therefore, the aim of the present study was to expand our view of the metabolic activity of *S. thermophilus* in the intestinal environment and to investigate its relationship with the host. To do this, we assessed the behavior of two sequenced strains of *S. thermophilus*, LMD-9 and LMG18311, in gnotobiotic rats. We established the first global protein profile of *S. thermophilus* after its survival in GIT in mono-associated rats. We also described how *S. thermophilus* influences colonic epithelium, focusing on monocarboxylic

^{*} This work was supported by Syndifrais-CNIEL (Paris, France).

^[S] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Table 1.

¹ To whom correspondence may be addressed. Tel.: 33-1-34652148; Fax: 33-1-34652462; E-mail: francoise.rul@jouy.inra.fr.

² To whom correspondence may be addressed. Tel.: 33-1-34652835; Fax: 33-1-34652462; E-mail: muriel.thomas@jouy.inra.fr.

³ The abbreviations used are: GIT, gastrointestinal tract; PCNA, peripheral cell nuclear antigen; GF, germ-free.

acid transporters and cell cycle arrest proteins. In view of our findings using different mono-associated models, we propose that lactate resulting from the adaptive metabolic activity of *S. thermophilus* may serve as a biological signal to communicate with host epithelium.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Bacterial Strains, Media, and Culture Conditions—The strains *S. thermophilus* LMD-9 (ATCC BAA-491), *S. thermophilus* LMG18311 (Belgian Coordinated Collections of Microorganisms collection), *L. bulgaricus* ATCC11842, *Bacteroides thetaiotaomicron* (BtII8), and *Ruminococcus gnavus* (FRE1) were used.

Stock cultures of *S. thermophilus* LMD-9, *S. thermophilus* LMG18311, and *L. bulgaricus* ATCC11842 were prepared in reconstituted 10% (w/v) Nilac skim milk (NIZO, Ede, The Netherlands) as described previously (19). *S. thermophilus* monocultures and *S. thermophilus*/*L. bulgaricus* co-cultures were obtained by inoculating Nilac milk with 10^6 cfu/ml stock cultures of each species and incubated at 42 °C until pH 5.4–5.5. One ml of culture was used for rat gavage, and the remaining was liquid nitrogen-frozen and stored at –20 °C until protein extraction. The cultures were enumerated *a posteriori* by plating appropriate dilutions on M17 agar lactose (10 g/liter) for *S. thermophilus* or on acidified MRS agar lactose (20 g/liter) (pH 5.2) for *L. bulgaricus*. After 16 h (*S. thermophilus*) or 24 h (*L. bulgaricus*), incubation at 42 °C under anaerobiosis (Anaerocult A, Merck), colonies were counted.

Animals and Experimental Design—All procedures were carried out according to European and French guidelines for the care and use of laboratory animals (permission 78-123, dedicated to M.T.).

At the age of 2 months, germ-free (GF) rats (male, Fisher 344) were inoculated either with *S. thermophilus* LMD-9 (Ino-LMD9, $n = 11$), with *S. thermophilus* LMG18311 (Ino-LMG18311, $n = 4$), or with a mix of *S. thermophilus* and *L. bulgaricus* (Ino-LMD9+Lb, $n = 5$) according to the following protocol. 1 ml of a culture of *S. thermophilus* in Nilac milk (5×10^8 *S. thermophilus*/ml) or 1 ml of a co-culture with *S. thermophilus* (2×10^9 *S. thermophilus*/ml) and *L. bulgaricus* (8×10^7 *L. bulgaricus*/ml) were transferred to GF rat by oral gavage. As a control, GF rats were also inoculated with 1 ml of sterile Nilac milk (without bacteria). GF, mono-associated, and di-associated rats were housed in sterile Plexiglas isolators (Ingénia, Vitry-sur-Seine, France). Rats mono-associated with either *B. thetaiotaomicron* (Ino-Bt) or *R. gnavus* (Ino-Rg) were described previously (17). All groups of rats received the same standard diet (UAR, Villemoisson, France) which was sterilized by γ -irradiation. Throughout the experiment and two times a week, *S. thermophilus* (and *L. bulgaricus* in the case of Ino-LMD9+Lb) was enumerated by plating serial dilutions of the feces. All rats were euthanized at 3 months of age (*i.e.* 30 days after inoculation).

At 9:00 a.m., rats were anesthetized with isoflurane, and tissues were recovered. The colon was immediately used either for cell isolation or for histological procedures. The luminal content of jejunum, ileum, cecum, and feces was diluted in 10 volumes of M17 and vigorously vortexed with sterile glass beads

(3.5-mm diameter), and bacteria were enumerated. All results were expressed as $\log_{10}$ (cfu/g).

HT29 Cell Line—HT29 cells were cultivated as described previously (20) and incubated with 0, 20, or 50 mM L-lactate for 18 h.

Scanning Electron Microscopy—Scanning electron microscopy (21) analyses were performed on the MIMA2 platform (available on the World Wide Web) with 0.2 g of cecal samples being suspended in 1 ml of Tris buffer (0.1 M, pH 7.5) and mixed. Debris were removed by centrifugation at $1000 \times g$ for 5 min at 4 °C. Supernatant of cecal samples was centrifuged to recover bacteria, and the pellets were suspended in 0.1 M Tris buffer (pH 7.5) and washed twice in the same buffer by centrifugation at $5000 \times g$ for 5 min at 4 °C. The bacterial pellets were suspended and fixed in 200 μ l of glutaraldehyde, 3% ruthenium red and stored at 4 °C. Scanning electron microscopy was performed as reported previously (22).

Protein Extraction—Bacteria were isolated as follows. 500 ml of frozen milk cultures (three replicates) were homogenized with an Ultra-turrax (Bioblock, Paris, France). The suspension was centrifuged at $8000 \times g$ for 10 min at 4 °C and washed three times in sodium phosphate buffer (5 mM) containing 1 mM EDTA, pH 7; bacteria were suspended in 2 ml of sodium phosphate buffer (20 mM, pH 7). Frozen feces from three Ino-LMD9 rats were pooled, and 12 g of feces were suspended in 25 ml of sodium phosphate buffer (20 mM, pH 6.4), homogenized with an Ultra-turrax, and fecal debris was removed by two successive centrifugations at $400 \times g$ for 5 min at 4 °C. The bacteria were then collected by centrifugation at $5000 \times g$ for 10 min at 4 °C and washed three times with sodium phosphate buffer (20 mM, pH 6.4), and the pellets were suspended in 2 ml of this buffer. Bacterial pellets from milk cultures and feces were then submitted to a high speed centrifugation on a Nycodenz density gradient as described previously (23). After ultracentrifugation, the bacterial suspensions were washed with 14 ml of sodium phosphate buffer (20 mM, pH 6.4), and the bacteria were recovered by centrifugation at $5000 \times g$ for 10 min at 4 °C.

The bacterial pellets were suspended in 0.5 ml of sodium phosphate buffer (20 mM, pH 6.4) containing protease inhibitor mixture (Sigma-Aldrich), 40 units/ml catalase, and 10 mM tributylphosphine (Applied Biosystems). Cells were mechanically disrupted with an FP120 FastPrep cell disruptor (Bio 101 Systems, Qbiogen, Irvine, Canada) by two 30-s cycles of homogenization at maximum speed (6.5) at a 1-min interval at 4 °C. Supernatants were collected by centrifugation at $5000 \times g$, 15 min at 4 °C, and centrifuged ($200,000 \times g$, 30 min, 4 °C); they corresponded to cytoplasmic proteins, whereas the pellet was a fraction enriched with envelope-associated proteins. The protein concentrations were determined by the Coomassie protein assay reagent (Pierce), using bovine serum albumin as a standard.

One-dimensional Electrophoresis Coupled to Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) Analysis—Proteins of the cell envelope-enriched fraction (4.7 μ g) from fecal sample were separated and identified by one-dimensional electrophoresis (SDS-PAGE) coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry as described previously (24).

Comparative Two-dimensional Protein Analysis and Image Analysis—A volume of cytosolic fraction corresponding to 250 μg of proteins was treated as described previously (25). Fractions of three independent cultures in milk were analyzed. Fractions of two fecal batches were used, each batch resulting from the pool of feces of three rats. Isoelectric focusing was performed with a 24-cm pH 4–7 immobilized pH gradient strip, and 12% SDS-PAGE was used for the second dimension. The gels were stained with BioSafe colloidal Coomassie blue (Bio-Rad) for 1 h and rinsed out with three successive washes in deionized water. Gels were digitized using an Epson Expression 1640XL scanner set (at 256 gray levels) controlled by the Silver Fast software and analyzed using the Progenesis SameSpot software (Nonlinear Dynamics). The relative volume of each spot was obtained from its intensity and normalized with the intensity of all spots. Only spot volume differences of at least 2-fold between the milk and fecal samples were further analyzed. 276 different protein spots on pH 4–7 two-dimensional electrophoresis gels were detected. MS analyses were performed using a Voyager-DE-STR (Applied Biosystems, Framingham, MA) on the PAPSSO proteomic platform (available on the World Wide Web). The proteins were identified using MS-FIT (available on the World Wide Web).

Western Blot Analysis—Colonic epithelial cells were isolated from the whole colon according to the method described by Cherbuy *et al.* (26). Cell pellet from whole colon or from HT29 cells was immediately used for protein extraction. Western blot analysis was performed as described previously (17) by using a denaturing (SDS)-polyacrylamide gel. Proteins were analyzed using anti-PCNA (GeneTex; diluted 1:1000), anti-p21^{cip1} (Oncogene (diluted 1:200) or Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA) (diluted 1:200)), anti-p27^{kip1} (Santa Cruz Biotechnology, Inc.; diluted 1:500), or anti-Bcl2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.; diluted 1:400). Several loading controls were used, either GAPDH, Skp1, or cullin1 (17). Signals imprinted on autoradiography films were quantified by scanning densitometry of the autoradiograph using Biovision 1000 and logiciel bio1D (Vilber Lourmat, France).

Dosage of D- and L-Lactates—D- and L-lactates were measured in cecal contents and feces of GF and mono-associated rats by 2 $\times$ diluting of 50–100-mg samples in 0.1 M triethanolamine buffer (pH 9.15). Samples were centrifuged at 13,000 $\times g$ for 5 min at 4 $^{\circ}\text{C}$, and the supernatants were precipitated with trichloroacetic acid (10%) and centrifuged at 4500 $\times g$ for 20 min at 4 $^{\circ}\text{C}$. The lactates were measured in the supernatants with Biosentec D/L-lactic acid enzymatic kits according to the manufacturer's instructions (Biosentec, Toulouse, France).

Histology and Immunohistochemistry—Colon samples were cut into 2-cm sections, fixed in 4% paraformaldehyde (4 h, room temperature), dehydrated, and embedded in paraffin according to standard histological protocols. 4–5- μm sections were mounted on SuperFrost[®] Plus slides. Slides were stained with hematoxylin and eosin for histological analysis. Crypt depths were analyzed with ImageJ. Only U-shaped longitudinally cut crypts with open lumina along the crypt axis were evaluated. Immunological staining was done with primary antibody anti-PCNA (GeneTex; dilution 1:5000) and with the Envision+ system-HRP (Dako, France) according to the

recommendations of the manufacturer. Antigen retrieval was performed by boiling slides for 40 min in 0.01 mol/liter sodium citrate, pH 6.0. Results were expressed as a percentage of PCNA-positive cells relative to total colonic crypt cells. Results were the mean obtained by analysis at least 20 crypts/rat ($n = 2$).

RNA Isolation and Quantitative RT-PCR Analysis—Total RNAs were extracted from colon epithelial cells of GF and mono-associated with *S. thermophilus* LMD-9 strain by the guanidinium thiocyanate method (27). The RNA yield was quantified by spectrophotometer analysis, and the RNA purity was determined by an Agilent 2100 Bioanalyzer analysis using the RNA 6000 nanoassay kit. Reverse transcription was performed with 1 μg of total rat RNA using the iScript[™] cDNA synthesis kit (Bio-Rad).

For the p27^{kip1} gene, quantitative RT-PCR was performed on the Opticon Monitor 3 (Bio-Rad) using specific primers and Master Mix (2 $\times$) Universal (KAPA SYBR[®] FAST qPCR Kits, Kapa Biosystems). Primers were 5'-GGCGGCAAGATGTCAAACGTG-3' and 5'-GGGCCGAAGAGGTTTCTG-3'. Primers were validated to ensure efficient amplification of a single product at 60 $^{\circ}\text{C}$ (annealing temperature). Comparisons were made by using GAPDH as the reference gene and the p27^{kip1} gene as the target gene.

For SLC16A1, SLC16A2, and SLC5A8 genes, real-time quantitative PCR was performed on cDNAs in an ABI PRISM 7000 sequence detection system. Rn00562332-m1, Rn00596041-m1, and Rn01503812-m1 TaqMan references were used for SLC16A1, SLC16A2, and SLC5A8, respectively (Applied Biosystems). 18 S rRNA was used as a reference gene and measured with an Hs99999901-s1 TaqMan gene expression assay. Results obtained on each transporter were normalized to 18 S rRNA (reference gene) and compared with the mean target gene expression of GF rats as calibrator sample. At least four rats were used for each group of rats (GF and Ino-LMD9). The formula used was the equation, -fold change = $2^{-\Delta\Delta C_t}$, where $\Delta\Delta C_t = (C_{t_{\text{target}}} - C_{t_{\text{reference}}})_{\text{sample}} - (C_{t_{\text{target}}} - C_{t_{\text{reference}}})_{\text{calibrator sample}}$.

Statistical Analysis—Results are presented as means $\pm$ S.E. for the number of animals indicated. Comparisons of group data between different batches of rats were performed using one-way analysis of variance, followed by Tukey's Student range test where appropriate. Significance was a p value lower than 0.05. Statistical analysis was performed using the JMP[®] software (version 7, SAS Institute, Inc.).

RESULTS

Progressive Adaptation of *S. thermophilus* to the GIT—After a single gavage, *S. thermophilus* LMD-9 progressively colonized the GIT of GF rats, leading to Ino-LMD9 mono-associated rats (Fig. 1A). The implantation of *S. thermophilus* LMD-9 occurred in a three-step way: 1) initiation phase with implantation of 10⁵ cfu/g of feces; 2) growth period between weeks 2 and 3, where it reached a population of 10⁸ cfu/g of feces; and 3) maintenance phase (post-third week). Thus, 4 weeks were necessary to reach a level of 10⁸ cfu/g of feces. At day 30, the population of *S. thermophilus* LMD-9 was higher in the distal digestive compartment with an increasing gradient of population from jejunum

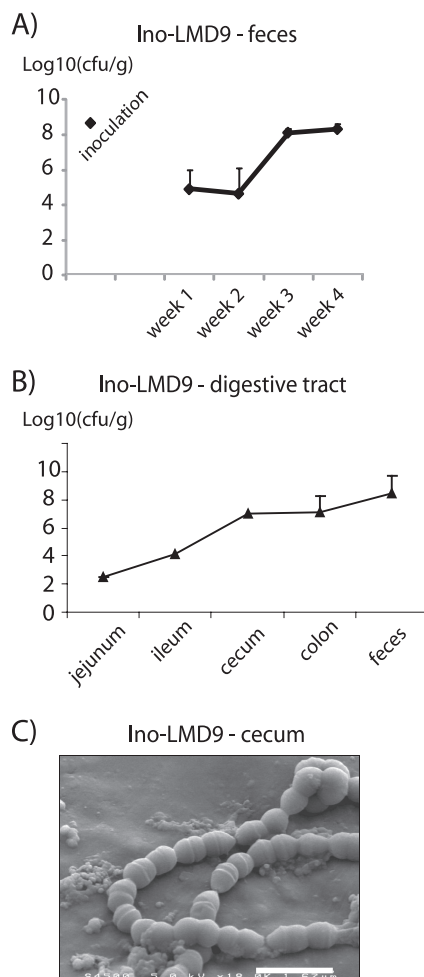


FIGURE 1. *S. thermophilus* in the digestive tract. Shown is enumeration of viable *S. thermophilus* isolated from feces (A) and different rat digestive tract sections (B) of Ino-LMD9 rats. Fecal or luminal samples were diluted and immediately plated on culture medium M17 + lactose. Colonies were numbered after a 24-h anaerobic culture. Results are expressed on a log scale. *n*, number of rats used. C, snapshot of *S. thermophilus* isolated from cecum of Ino-LMD9 rats obtained by scanning electron microscopy. Error bars, S.E.

(1.6×10^3 cfu/ml) to colon (9.3×10^8 cfu/ml) (Fig. 1B). The progressive implantation curve was also observed with another strain of *S. thermophilus*, LMG18311 (Ino-LMG18311 rats). In Ino-LMG18311 rats, the final implantation of LMG18311 was similar to that obtained with LMD-9, with 2×10^8 cfu/g ($n = 4$). To mimic the levels present in yogurt, GF rats were inoculated with a co-culture containing 10^9 cfu/ml *S. thermophilus* LMD-9 and 10^7 cfu/ml *L. bulgaricus*, in accordance with the relative proportion of both strains in yogurt. 24 h after gavage, *L. bulgaricus* was undetectable in feces, whereas the implantation curve of *S. thermophilus* LMD-9 was similar to that observed with Ino-LMD9 (data not shown). The progressive implantation of *S. thermophilus* suggested that an adaptation of *S. thermophilus* occurred in the GIT.

It has been previously shown that the morphology of *Lactobacillus sakei* changed after its survival through the GIT (28). Thus, the global morphology of *S. thermophilus* recovered from cecum of Ino-LMD9 rats was observed by scanning electron microscopy (Fig. 1C). In cecum, *S. thermophilus* exhibited the

expected ovococcus-shaped chains and was present as dividing cells with visible septa.

Proteomic Profiles of *S. thermophilus* in the Digestive Tract—In the feces of Ino-LMD9 rats, proteins of *S. thermophilus* were analyzed by LC-MS/MS, listed (see supplemental Table 1), and classified into different functional categories (Fig. 2). This result showed that the main *S. thermophilus* LMD-9 proteins expressed in the GIT are involved in staple cellular functions, such as translation, carbon metabolism, nitrogen metabolism, nucleic base metabolism, or transport. This indicated that *S. thermophilus* LMD-9 was metabolically active in the rat GIT 30 days after inoculation.

Using a comparative proteomic analysis, we then identified the proteins that were differentially produced when *S. thermophilus* LMD-9 was grown in milk (inoculum) or when it was recovered from feces of Ino-LMD9 rats (day 30). In both conditions, bacterial populations were similar (*i.e.* $1\text{--}5 \times 10^8$ cfu/ml) (Fig. 1). 52 proteins displayed different abundances between the two conditions; 11 were up-regulated (induction from 2- to 11-fold), and 41 were down-regulated (repression from 3- to 25-fold) in feces compared with milk (Table 1).

Of the 11 up-regulated proteins, three are related to environmental signal responses: SodA (superoxide dismutase) and GroEL, which are stress proteins, and EF-Tu (elongation factor Tuf), which is a translation/adhesion-related protein. The remaining up-regulated eight proteins in the gut played a role in carbon metabolism, specifically in the glycolytic pathway. We have also verified that these proteins involved in glycolysis were more abundant in feces of Ino-LMG18311 than in milk (data not shown). Thus, proteins involved in glycolysis that are already expressed at a high level in milk (25) were overexpressed after survival in GIT. The proteins down-regulated in feces compared with milk were involved in protein synthesis, cell division (FtsZ), nucleotide biosynthesis and salvage (PyrG, PurC, PurL, and GuaB), energy provision (F_0F_1 -ATP synthase AtpD), and iron metabolism (Dpr bacterioferritin). Overall, the proteins of the two strains of *S. thermophilus* that were overexpressed in the GIT compared with milk are devoted to the glycolytic pathway.

Production of Lactate by *S. thermophilus* in the Digestive Tract—Considering the preponderant abundance of enzymes involved in glycolysis, L-lactate concentration was measured in the cecum of gnotobiotic rats. Although no lactate (neither D- nor L-lactate) was found in GF rats, 13.6 ± 0.9 and 9.8 ± 2.5 mM L-lactate was detected, respectively, in cecum and feces of Ino-LMD9 rats. Note that only the L-form was detected in cecum of Ino-LMD9 rats, as expected due to the well known capacity of *S. thermophilus* to produce this isoform. This production of L-lactate did not induce any acidification of the cecal content of Ino-LMD9 rats (mean pH 7.7 ± 0.08 , $n = 11$; versus pH 7.7 ± 0.2 , $n = 6$ GF). Acetate, propionate, and butyrate levels in Ino-LMD9 (1.8 ± 0.7 , <0.1 , and <0.1 mM respectively) were not statistically different from that obtained with GF rats (1.7 ± 1 , <0.1 , and <0.1 mM). Similar cecal concentration of lactate was measured in Ino-LMG18311 rats (10.02 ± 3.0 mM) and in Ino-LMD9+Lb rats (9.91 ± 0.99 mM); thus, lactate was

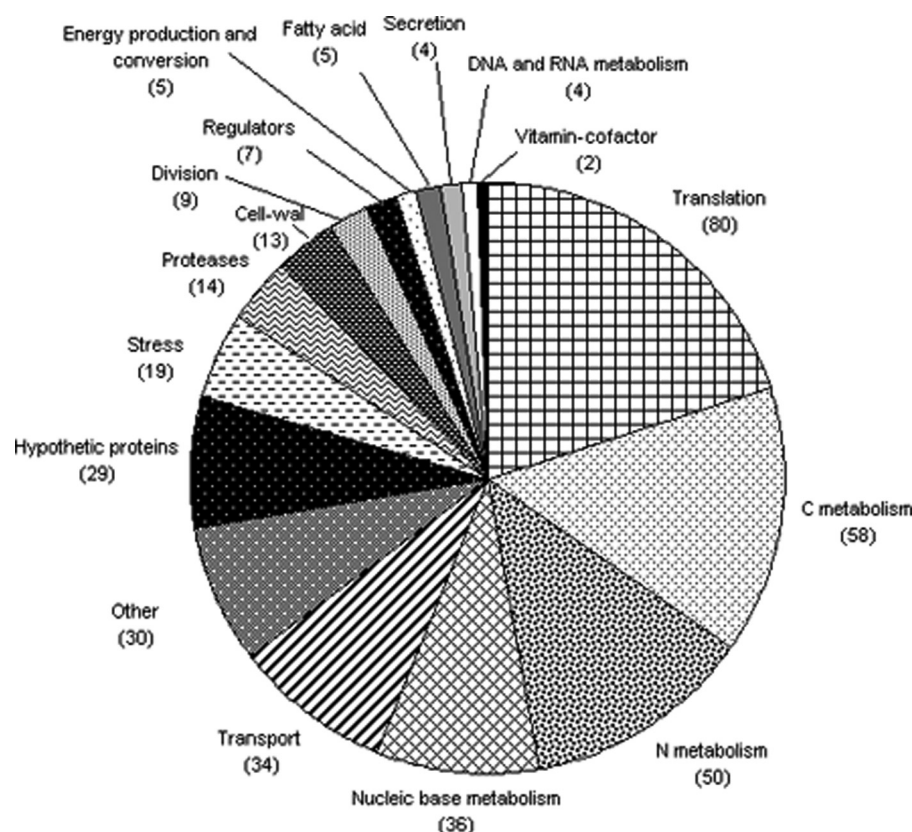


FIGURE 2. **Functional distribution of the proteins of *S. thermophilus* LMD-9 isolated from rat feces.** Proteins from the envelope-enriched fraction were separated and identified by LC-MS/MS. *Transport* and *Regulators*, proteins involved in transport and regulators, other than those involved in carbon metabolism, nitrogen metabolism, and nucleic base metabolism. The numbers of proteins are shown in parentheses.

found in GIT of mono-associated rats with two different *S. thermophilus* strains.

Cross-talk between *S. thermophilus* and the Colonic Epithelium— In the intestine, epithelial cells expressed a set of carriers involved in the transport of luminal metabolites, such as short chain fatty acids (29). Thus, we quantified at the mRNA level in GF and Ino-LMD9 rats three transporters that are able to shuttle monocarboxylic acid as lactate (SLC16A1, SLC16A2, and SLC5A8). In both lots of rats, the three RNAs were differently abundant, with the following hierarchy of expression levels: SLC16A1 > SLC5A8 > SLC16A2 (data not shown). The SLC16A1 mRNA amount was statistically different ($p < 0.05$) between GF (mean $\Delta Ct = 14.9 \pm 0.1$, $n = 6$) and Ino-LMD9 rats ($\Delta Ct = 13.8 \pm 0.1$, $n = 8$), that represented a 2.2-fold stimulation in the presence of LMD-9. SLC5A8 was significantly 1.7-fold more expressed in Ino-LMD9 ($n = 8$) than in GF rats ($n = 5$), whereas SLC16A2 tended to be more expressed in Ino-LMD9, but it was not statistically different. This observation suggests that lactate produced in lumen by LMD-9 may be transported inside the colonic cells. Because of the pivotal role of bacterial metabolites in colonic tissue homeostasis, we studied in Ino-LMD9 and GF rats the global structure of colonic epithelium and the content of cell cycle-related proteins. The colonic tissue of Ino-LMD9 rats was structured in crypts (Fig. 3A), with a 196 ± 26 - μ m crypt depth mean and the detection of bifurcating crypts (noted with arrows in Fig. 3, A and B); the global histological trait of colonic epithelium in Ino-LMD9 rats was thus similar to that we have previously observed in GF rats

(17). Because it is well established in colon tissue, the proliferating cells, stained by PCNA (Fig. 3B) or by Ki67 (data not shown), were located at the bottom of crypt in Ino-LMD9 rats. The PCNA-positive cells represented $60 \pm 5\%$ of total cells inside a crypt structure ($n = 2$ rats, 20 measures/rat). This percentage was similar to what we obtained with GF rats (17). When comparing the amount of colon proteins involved in cell cycle between Ino-LMD9 and GF rats, we noticed that PCNA, Bcl2, and p21^{cip1} were similar between GF and Ino-LMD9 rats (Fig. 3B), whereas p27^{kip1} abundance was significantly higher (1.8-fold induction) in the presence of *S. thermophilus* LMD-9. The induction of p27^{kip1} was also observed in Ino-LMG18311 (2-fold) and Ino-LMD9+Lb (1.5-fold) (Fig. 4). In contrast to the protein level, the p27^{kip1} mRNA amount was not statistically different between GF (mean $\Delta Ct = 4.8 \pm 0.3$, $n = 3$) and Ino-LMD9 rats ($\Delta Ct = 4.7 \pm 0.1$, $n = 4$). Thus, the induction of protein p27^{kip1} was observed *in vivo* with two different strains of *S. thermophilus* and did not result from a parallel induction at the p27^{kip1} mRNA level.

In the epithelial keratinocyte cell line, p27^{kip1} is induced by lactate *in vitro* (30). By using intestinal line cells (HT29), we also observed that 20–50 mM L-lactate for 18 h increased 1.5-fold p27^{kip1} protein amounts (see Fig. 4A). Taken together, our data suggest that lactate accumulates in the GIT of mono-associated rats, is transported by carriers inside colonic cells, and may increase p27^{kip1} abundance. In order to demonstrate the preponderant role of lactate, we have tried to inactivate in LMD-9 the *ldh* gene encoding the lactate dehydrogenase responsible

TABLE 1

-Fold changes in protein abundance (two-dimensional electrophoresis) of *S. thermophilus* LMD-9 between feces and late growth phase in milk

Gene/locus	pI ^a	MW ^b (kDa)	Peptide number ^c	Sequence coverage (%)	Fold change	Protein identification
Higher level in TD						
<i>eno</i>	4.67	47	22	63	3.06	Carbohydrate metabolism Phosphoenolpyruvate carboxylase Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase Putative L-2-hydroxy isocaproate/malate/lactate dehydrogenase 4- α -glucanotransferase 3-phosphoglycerate kinase 6-phosphofructokinase Pyruvate kinase Fructose/tagatose bisphosphate aldolase Stress Superoxide dismutase (Mn) Chaperonin GroEL (HSP60 family)
<i>gapA1</i>	5.76	37.2	18	60	4.69	
<i>hdhL</i>	5.09	34.4	11	41	2.97	
<i>malQ</i>	5.2	57.6	13	28	2.39	
<i>pgk</i>	4.86	42.2	17	54	3.02	
<i>pfkA</i>	5.09	36.0	13	38	7.67	
<i>pyk</i>	5.21	56.6	17	49	3.01	
<i>ster_1876</i>	4.81	31.5	9	47	6.05	
<i>sodA</i>	5.1	24.7	6	48	2.44	
<i>groEL</i>	4.7	56.9	35	69	2.46	
<i>tuf</i>	4.9	43.9	15	45	11.76	
Lower level in TD						
<i>alaS</i>	5.03	96.7	25	31	0.12	Transcription, translation Alanyl-tRNA synthetase Asparaginyl-tRNA synthetase Aspartyl-tRNA synthetase Translation elongation factor (GTPase) Glutamyl- and glutaminyl-tRNA synthetase Glycyl-tRNA synthetase, alpha subunit Glycyl-tRNA synthetase, beta subunit Histidyl-tRNA synthetase Leucyl-tRNA synthetase Ribosomal protein L10 Ribosomal protein L7/L12 DNA-directed RNA polymerase, beta subunit/140 kD subunit Ribosomal protein S1 30S ribosomal protein S2 Putative translation factor Threonyl-tRNA synthetase FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (trigger factor) Translation elongation factor Ts Nitrogen metabolism Amino acids biosynthesis asparagine synthetase A branched chain amino acid aminotransferase cysteine synthase diaminopimelate decarboxylase S-adenosylmethionine synthetase glutamine synthetase Peptidases aminopeptidase C aminopeptidase N Nucleotide biosynthesis and salvage CTP synthase (UTP-ammonia lyase) phosphoribosylaminoimidazole – succinocarboxamide synthase phosphoribosylformylglycinamidine synthase II (FGAM synthetase) IMP dehydrogenase/GMP reductase Cell division protein Cell division GTPase Carbohydrate metabolism Glutamate dehydrogenase/leucine dehydrogenase Miscellaneous F0F1-type ATP synthase, beta subunit DNA-binding ferritin-like protein UDP-N-acetylmutamate-alanine ligase ketopantoate reductase Preprotein translocase subunit SecA hypothetical protein Predicted kinase related to dihydroxyacetone kinase ATPase component of ABC transporter with duplicated ATPase domain Predicted membrane GTPase involved in stress response
<i>asnS</i>	4.93	51.1	27	51	0.1	
<i>aspS</i>	4.81	65.9	21	37	0.19	
<i>fus</i>	4.88	76.6	37	62	0.25	
<i>glhX</i>	4.97	55.3	26	47	0.29	
<i>glyQ</i>	4.91	34.9	9	33	0.11	
<i>glyS</i>	5.05	78.5	22	38	0.09	
<i>hisS</i>	5.44	48.4	18	49	0.23	
<i>leuS</i>	4.99	94.4	13	17	0.11	
<i>rpL</i>	5.36	17.5	7	43	0.33	
<i>rpL</i>	4.42	12.4	9	81	0.1	
<i>rpoB</i>	5.02	29.2	13	50	0.33	
<i>rpsA</i>	4.88	43.9	21	55	0.1	
<i>rpsB</i>	5.3	28.4	12	43	0.12	
<i>ster_1166</i>	5.02	29.2	13	50	0.33	
<i>thrS</i>	5.39	74.8	36	45	0.06	
<i>tig</i>	4.41	46.7	22	53	0.16	
<i>tsf</i>	4.75	37.4	15	60	0.04	
<i>asnA</i>	5.1	37.5	13	31	0.14	
<i>bcaT</i>	4.9	37.5	9	30	0.22	
<i>cysM1</i>	5.2	32.3	15	51	0.31	
<i>lysA</i>	4.81	46.4	10	38	0.17	
<i>metK</i>	4.93	44.7	15	44	0.33	
<i>ster_1751</i>	4.87	50.1	11	32	0.16	
<i>pepC</i>	4.85	50.4	9	17	0.16	
<i>pepN</i>	4.59	96.3	15	19	0.18	
<i>pyrG</i>	5.51	59.1	12	28	0.26	
<i>purC</i>	5.00	27	22	80	0.25	
<i>purL</i>	4.93	136	19	19	0.05	
<i>guaB</i>	5.31	52.9	13	29	0.07	
<i>ftsZ</i>	4.6	46.5	17	43	0.38	
<i>gdhA</i>	5.21	48.9	19	56	0.13	
<i>atpD</i>	4.73	50.9	11	32	0.14	
<i>dpr</i>	4.59	19.2	5	29	0.18	
<i>murC</i>	5.23	49.6	15	44	0.17	
<i>panE</i>	5.6	36.1	13	42	0.40	
<i>secA</i>	5.22	96.4	28	41	0.09	
<i>ster_0157</i>	4.77	46.4	15	38	0.22	
<i>ster_1854</i>	4.41	59.5	17	32	0.21	
<i>ster_1995</i>	4.74	60.9	23	49	0.18	
<i>typA</i>	4.9	68.7	21	38	0.09	

^a Theoretical isoelectric point.^b Theoretical molecular weight.^c Number of peptides identified.

for lactate production. We have failed to generate this mutant (data not shown), confirming previous unsuccessful attempts to obtain this probably lethal mutant (31). However, in rats mono-associated with *Bacteroides thetaiotaomicron* (Ino-Bt) or *Ruminococcus gnavus* (Ino-Rg) (17) containing 0 and 3.2 ± 0.7 mM of cecal lactate, respectively, no p27^{kip1} induction was observed in comparison with GF (Fig. 4B).

DISCUSSION

In order to gain a better understanding of the behavior of lactic acid bacteria within the intestinal environment and the complex bacterium/host cross-talk system, here we combined *in vivo* characterization of *S. thermophilus* metabolism and the resulting host response. This study led to novel insights into the interplay between *S. thermophilus* and the host through its major metabolite product, lactate.

The implantation of *S. thermophilus* in GF rats occurred progressively, and this trend was observed with both strains studied, LMD-9 and LMG18311. These two strains differ in particular by the presence of a cell wall protease, PrtS, and a sortase, A1, present in the LMD-9 strain. This suggests that the latter proteins were probably not essential for the kinetics of implantation of this bacterium. In contrast to *S. thermophilus*, the implantation was maximal in a few days for *Escherichia coli* (32), *R. gnavus* and *B. thetaiotaomicron* (17), *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium breve* (33), and *Lactococcus lactis* (23). This adaptive response of *S. thermophilus* was not accompanied by significant morphological changes, contrary to what was observed with *L. sakei* or *E. coli* (28, 34). The proteomic analysis of *S. thermophilus* before (milk inoculum) and after GIT transit (feces) shed light on its adaptive metabolic profile. Indeed, we showed that the main response to the passage of *S. thermophilus* through the rat GIT was the massive induction, at the maintenance phase, of the glycolysis pathway leading to formation of lactate in cecum. Here, we propose that *S. thermophilus* modulates p27^{kip1} through production of lactate. This hypothesis stems from five observations: 1) the main *S. thermophilus* metabolic pathway enhanced in GIT compared with a milk culture was the glycolysis leading to production of lactate; 2) two transporters of monocarboxylic acids were induced in Ino-LMD9, suggesting that lactate may be shuttled in colonic cells; 3) the increase of p27^{kip1} level in the colon was observed in the presence of two *S. thermophilus* strains producing equivalent amounts of lactate; 4) the increase of p27^{kip1} level in the colon did not appear in the presence of non-lactate-producing or low lactate-producing bacteria (*B. thetaiotaomicron* and *R. gnavus*); and 5) p27^{kip1} was induced *in vitro* by the presence of lactate in intestinal epithelial cells (Fig. 4A) and in keratinocytes (30). Obviously, our hypothesis does not exclude other underlying mechanisms involved in the interplay between *S. thermophilus* and the host (see below).

The massive induction of glycolysis in GIT compared with milk was unexpected for *S. thermophilus* because these proteins are already present at high levels in the milk (25). The capacity for a bacterium to diversify its carbon sources seems to be essential for the colonization in GF rodents (23, 32, 35–37). *S. thermophilus* is particularly well adapted to milk, in particular via the assimilation of lactose, which is its preferential sugar

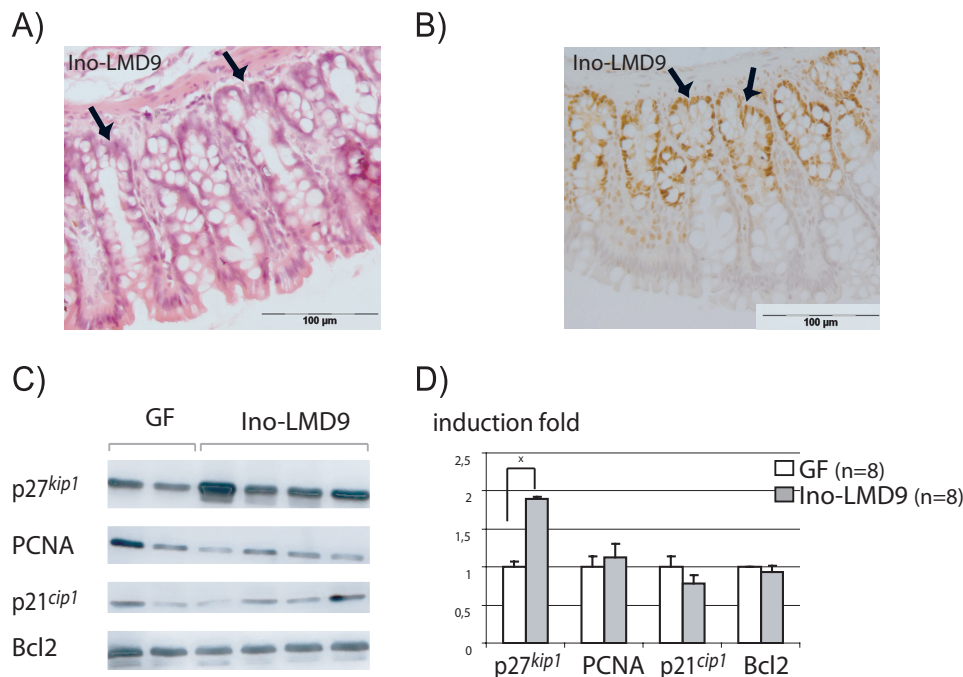


FIGURE 3. **Histological and molecular analysis of the colonic epithelium of Ino-LMD9 rats.** A, representative photomicrograph of colonic sections obtained from Ino-LMD9 rats stained with hematoxylin and eosin. The arrows indicate a bifurcating crypt in the colonic epithelium. B, representative photomicrograph of immunohistochemical staining with PCNA in the colon of Ino-LMD9 rats. C, representative autoradiography films of Western blot revealing p27^{kip1}, PCNA, p21^{cip1}, and Bcl2 from colonic epithelial cells of GF (n = 2) and Ino-LMD9 (n = 4) rats. D, quantifications of Western blot by densitometric analysis are means $\pm$ S.E. (error bars) obtained with eight Ino-LMD9 rats and eight GF rats. Values are expressed as -fold induction considering the mean of the GF group (n = 8) as 1. *, statistically significant differences ($p < 0.05$) between groups.

and is present at high and non-limiting concentrations in milk (4.5 g/liter). However, we showed here that *S. thermophilus* may develop an efficient ability to use other sources of saccharides present in GF rat (38) because the rat diet did not contain lactose. This flexibility is rather unexpected because *S. thermophilus* has a small genome with a large proportion of nonfunctional genes (10% of pseudogenes), in particular genes involved in carbon utilization, in line with the paucity of carbon sources in milk (39). Therefore, it would be of interest to determine whether the implantation level and the adaptive responses of *S. thermophilus* may be improved by using mono-associated rats receiving a diet enriched with lactose, as previously suggested (40).

The use of mono-associated rats is an efficient tool to reveal the activity of bacterial proteins, especially those with dual functions. For example, EF-Tu is an elongation factor playing a key role in protein synthesis but also in the maintenance in the GIT. The up-regulation of EF-Tu was observed *in vivo* for *L. lactis* (41) and *Bifidobacterium* (42) and *in vitro* for *L. plantarum* (43). Although *S. thermophilus* reduced most of its translation and protein synthesis machinery, EF-Tu was the sole protein belonging to protein synthesis pathway that was increased at a high level in digestive tract compared with milk (induction factor 12). We thus propose that in Ino-LMD9 rats, EF-Tu, which displays the characteristics of an adhesion factor (21), is mainly involved in the maintenance of *S. thermophilus* rather than in the protein synthesis.

We have recently demonstrated that the colonization of GF rats with a complex microbiota leads to an increase in the absorptive surface by deepening crypts and splitting bifurcated crypts by a crypt fission process (17). This trophic effect of

microbiota is associated with a modulation of several cell cycle-related proteins. Along the colonization with a complex microbiota, we have previously described a precocious hyperproliferative phase at the level of colonic epithelium that is counterbalanced by an induction of proteins restraining the proliferation and a decrease of antiapoptotic proteins (17). In contrast to what was observed with a complex microbial population, the presence of *S. thermophilus* did not trigger deeper crypts and the division of bifurcating crypts. Thus, as we reported previously (17), a single strain is not sufficient to switch on proliferation and the associated greater absorptive surface. In contrast, the induction of cell cycle arrest proteins could be triggered by a single bacterium. Indeed, *B. thetaiotaomicron* and *R. gnavus* increased p21^{cip1} (17), whereas *S. thermophilus* increased p27^{kip1}. p21^{cip1} and p27^{kip1} are inhibitors of cyclin-dependent kinases and are preponderant cell cycle regulators in the GIT (44). In particular, p27^{kip1} is involved in the capacity of epithelium and host to attenuate deleterious effects of environmental stimuli (45). Thus, we have shown that p27^{kip1} is stabilized *in vivo* by a complex microbial population (17) and by *S. thermophilus* (Figs. 3 and 4). The induction of p27^{kip1} by a complex microbiota or by *S. thermophilus* may not result from similar mechanisms because no lactate was detected in luminal content of conventional rats (data not shown). It has also been observed that p27^{kip1} was enhanced by a bacterial cyclomodulin like Cif (cyclin inhibitor factor) (46). Thus, p27^{kip1} seems to be sensitive to different bacterial effectors.

The expression levels of the two transporters, SLC16A1 and SLC5A8, were stimulated in Ino-LMD9 rats, where luminal lactate was around 10 mM. Our observation is in accord with pre-

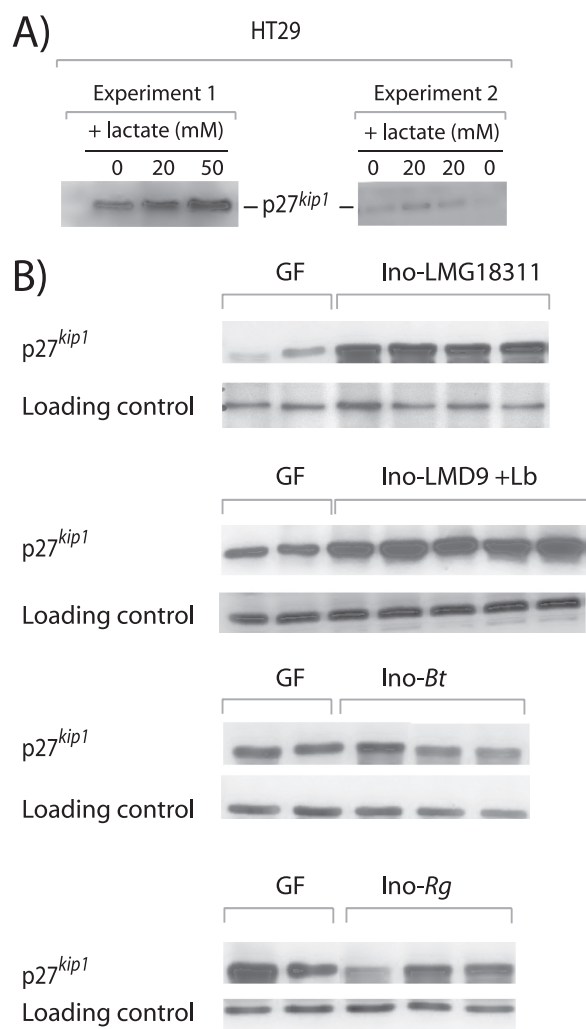


FIGURE 4. p27^{kip1} detection in the HT29 cell line and in different mono-associated rats. A, typical autoradiography films of Western blot revealing p27^{kip1} from HT29 incubated with 0, 20, or 50 mM L-lactate for 18 h (two independent experiments are shown). B, typical autoradiography films of Western blot revealing p27^{kip1} and loading control from colonic epithelial cells of GF ($n = 2$) and four different mono-associated lots of rats. Ino-LMG18311 ($n = 4$), Ino-Bt ($n = 3$), and Ino-Rg ($n = 3$), respectively, harbored *S. thermophilus* strain LMG18311, *B. thetaiotaomicron*, and *R. gnatus*. Ino-LMD9 + Lb rats ($n = 5$) have been inoculated with a mixture of *S. thermophilus* and *L. bulgaricus*. At the end of the experiment (30 days after the gavage), rats were only mono-associated with *S. thermophilus* because *L. bulgaricus* did not efficiently implant.

vious reports suggesting that monocarboxylic acid transporters provide a link between bacteria and the host (47–49). In human healthy adults, no or low (0–2 mM) lactate is detected in fecal samples (50, 51) because the luminal lactate is absorbed by host and is also used as an energy source by other commensal bacteria (52–54). However, increased fecal lactate has been associated with intestinal malabsorption and colitis (55). It could also be of interest to measure fecal lactate in humans with short bowel syndrome because we have shown that their microbiota is deeply enriched in lactobacilli at the expense of other bacterial members (22). Thus, the effect of lactate that we evidenced here by using a model of lactic acid bacteria in an experimental model may have significance in human digestive diseases.

Because *S. thermophilus* is able to adapt its global metabolism to the gut environment and to induce monocarboxylic acid

transporters and p27^{kip1}, this work provides new insights into the functional “panoply” of one of the two yogurt bacteria. Finally, the fact that *S. thermophilus* emphasizes its carbohydrate metabolism in the digestive tract is in accord with the beneficial role of fermented milk consumption in improving lactose intolerance.

Acknowledgments—We thank Nirina Rasoava and Catherine Philippe for technical assistance, Didier Chevret for LC-MS/MS analysis, and Thierry Meylheuc for SEM analyses. We thank the team of animal facilities (ANAXEM platform, MICALIS). We acknowledge Monique Zagorec and Mihai Covasa for fruitful discussions and critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- Guarner, F., Perdigon, G., Corthier, G., Salminen, S., Koletzko, B., and Morelli, L. (2005) *Br. J. Nutr.* **93**, 783–786
- Lomer, M. C., Parkes, G. C., and Sanderson, J. D. (2008) *Aliment Pharmacol. Ther.* **27**, 93–103
- Rabot, S., Rafter, J., Rijkers, G. T., Watzl, B., and Antoine, J. M. (2010) *J. Nutr.* **140**, 677S–689S
- Higashikawa, F., Noda, M., Awaya, T., Nomura, K., Oku, H., and Sugiyama, M. (2010) *Nutrition* **26**, 367–374
- Pagnini, C., Saeed, R., Bamias, G., Arseneau, K. O., Pizarro, T. T., and Cominelli, F. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 454–459
- Preidis, G. A., and Versalovic, J. (2009) *Gastroenterology* **136**, 2015–2031
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D. R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J. M., Hansen, T., Le Paslier, D., Linneberg, A., Nielsen, H. B., Pelletier, E., Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., Turner, K., Zhu, H., Yu, C., Li, S., Jian, M., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, X., Li, S., Qin, N., Yang, H., Wang, J., Brunak, S., Doré, J., Guarner, F., Kristiansen, K., Pedersen, O., Parkhill, J., Weissenbach, J., Bork, P., Ehrlich, S. D., and Wang, J. (2010) *Nature* **464**, 59–65
- Elli, M., Callegari, M. L., Ferrari, S., Bessi, E., Cattivelli, D., Soldi, S., Morelli, L., Goupil Feuillerat, N., and Antoine, J. M. (2006) *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 5113–5117
- Firmesse, O., Alvaro, E., Mogenet, A., Bresson, J. L., Lemée, R., Le Ruyet, P., Bonhomme, C., Lambert, D., Andrieux, C., Doré, J., Corthier, G., Furet, J. P., and Rigottier-Gois, L. (2008) *Int. J. Food Microbiol.* **125**, 176–181
- Mater, D. D., Bretigny, L., Firmesse, O., Flores, M. J., Mogenet, A., Bresson, J. L., and Corthier, G. (2005) *FEMS Microbiol. Lett.* **250**, 185–187
- Moreau, M. C., Thomasson, M., Ducluzeau, R., and Raibaud, P. (1986) *Reprod. Nutr. Dev.* **26**, 745–753
- Palmer, C., Bik, E. M., DiGiulio, D. B., Relman, D. A., and Brown, P. O. (2007) *PLoS Biol.* **5**, e177
- Perez, P. F., Doré, J., Leclerc, M., Levenez, F., Benyacoub, J., Serrant, P., Segura-Roggero, I., Schiffrin, E. J., and Donnet-Hughes, A. (2007) *Pediatrics* **119**, e724–e732
- Alam, M., Midtvedt, T., and Uribe, A. (1994) *Scand. J. Gastroenterol.* **29**, 445–451
- Nougayrède, J. P., Taieb, F., De Rycke, J., and Oswald, E. (2005) *Trends Microbiol.* **13**, 103–110
- Willing, B. P., and Van Kessel, A. G. (2007) *J. Anim. Sci.* **85**, 3256–3266
- Cherbuy, C., Honvo-Houeto, E., Bruneau, A., Bridonneau, C., Mayeur, C., Duée, P. H., Langella, P., and Thomas, M. (2010) *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **299**, G348–G357
- Drouault, S., Anba, J., and Corthier, G. (2002) *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 938–941
- Herve-Jimenez, L., Guilloard, I., Guedon, E., Gautier, C., Boudebouze, S., Hols, P., Monnet, V., Rul, F., and Maguin, E. (2008) *Proteomics* **8**, 4273–4286
- Druesne, N., Pagniez, A., Mayeur, C., Thomas, M., Cherbuy, C., Duée, P. H., Martel, P., and Chaumontet, C. (2004) *Carcinogenesis* **25**,

- 1227–1236
21. Dallo, S. F., Kannan, T. R., Blaylock, M. W., and Baseman, J. B. (2002) *Mol. Microbiol.* **46**, 1041–1051
22. Joly, F., Mayeur, C., Bruneau, A., Noordine, M. L., Meylheuc, T., Langella, P., Messing, B., Duée, P. H., Cherbuy, C., and Thomas, M. (2010) *Biochimie* **92**, 753–761
23. Roy, K., Meyrand, M., Corthier, G., Monnet, V., and Mistou, M. Y. (2008) *Proteomics* **8**, 1661–1676
24. Gardan, R., Besset, C., Guillot, A., Gitton, C., and Monnet, V. (2009) *J. Bacteriol.* **191**, 4647–4655
25. Derzelle, S., Bolotin, A., Mistou, M. Y., and Rul, F. (2005) *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 8597–8605
26. Cherbuy, C., Darcy-Vrillon, B., Morel, M. T., Pégrier, J. P., and Duée, P. H. (1995) *Gastroenterology* **109**, 1890–1899
27. Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987) *Anal. Biochem.* **162**, 156–159
28. Chiaramonte, F., Blugeon, S., Chaillou, S., Langella, P., and Zagorec, M. (2009) *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 4498–4505
29. Thwaites, D. T., and Anderson, C. M. (2007) *Exp. Physiol.* **92**, 603–619
30. Hsiao, Y. P., Huang, H. L., Lai, W. W., Chung, J. G., and Yang, J. H. (2009) *J. Dermatol. Sci.* **54**, 175–184
31. Hols, P., Hancy, F., Fontaine, L., Grossiord, B., Prozzi, D., Leblond-Bourget, N., Decaris, B., Bolotin, A., Delorme, C., Dusko Ehrlich, S., Guédon, E., Monnet, V., Renault, P., and Kleerebezem, M. (2005) *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 435–463
32. Alpert, C., Scheel, J., Engst, W., Loh, G., and Blaut, M. (2009) *Environ. Microbiol.* **11**, 751–761
33. Shima, T., Fukushima, K., Setoyama, H., Imaoka, A., Matsumoto, S., Hara, T., Suda, K., and Umesaki, Y. (2008) *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **52**, 69–77
34. Giraud, A., Arous, S., De Paepe, M., Gaboriau-Routhiau, V., Bambou, J. C., Rakotobe, S., Lindner, A. B., Taddei, F., and Cerf-Bensussan, N. (2008) *PLoS Genet.* **4**, e2
35. Bron, P. A., Grangette, C., Mercenier, A., de Vos, W. M., and Kleerebezem, M. (2004) *J. Bacteriol.* **186**, 5721–5729
36. Chang, D. E., Smalley, D. J., Tucker, D. L., Leatham, M. P., Norris, W. E., Stevenson, S. J., Anderson, A. B., Grissom, J. E., Laux, D. C., Cohen, P. S., and Conway, T. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 7427–7432
37. Marco, M. L., Peters, T. H., Bongers, R. S., Molenaar, D., van Hemert, S., Sonnenburg, J. L., Gordon, J. I., and Kleerebezem, M. (2009) *Environ. Microbiol.* **11**, 2747–2757
38. Sonnenburg, J. L., Xu, J., Leip, D. D., Chen, C. H., Westover, B. P., Weatherford, J., Buhler, J. D., and Gordon, J. I. (2005) *Science* **307**, 1955–1959
39. Bolotin, A., Quinquis, B., Renault, P., Sorokin, A., Ehrlich, S. D., Kulakauskas, S., Lapidus, A., Goltsman, E., Mazur, M., Pusch, G. D., Fonstein, M., Overbeek, R., Kyprides, N., Purnelle, B., Prozzi, D., Ngui, K., Masuy, D., Hancy, F., Burteau, S., Boutry, M., Delcour, J., Goffeau, A., and Hols, P. (2004) *Nat. Biotechnol.* **22**, 1554–1558
40. Mater, D. D., Drouault-Holowacz, S., Oozeer, R., Langella, P., Anba, J., and Corthier, G. (2006) *Br. J. Nutr.* **96**, 177–181
41. Beganović, J., Guillot, A., van de Guchte, M., Jouan, A., Gitton, C., Loux, V., Roy, K., Huet, S., Monod, H., and Monnet, V. (2010) *J. Proteome Res.* **9**, 677–688
42. Yuan, J., Wang, B., Sun, Z., Bo, X., Yuan, X., He, X., Zhao, H., Du, X., Wang, F., Jiang, Z., Zhang, L., Jia, L., Wang, Y., Wei, K., Wang, J., Zhang, X., Sun, Y., Huang, L., and Zeng, M. (2008) *J. Proteome Res.* **7**, 375–385
43. Ramiah, K., van Reenen, C. A., and Dicks, L. M. (2007) *Int. J. Food Microbiol.* **116**, 405–409
44. Besson, A., Dowdy, S. F., and Roberts, J. M. (2008) *Dev. Cell* **14**, 159–169
45. Zheng, Y., Bie, W., Yang, R., Perekatt, A. O., Poole, A. J., and Tyner, A. L. (2008) *Cancer Biol. Ther.* **7**, 873–879
46. Samba-Louaka, A., Nougayrède, J. P., Watrin, C., Jubelin, G., Oswald, E., and Taieb, F. (2008) *Cell Microbiol.* **10**, 2496–2508
47. Cresci, G. A., Thangaraju, M., Mellinger, J. D., Liu, K., and Ganapathy, V. (2010) *J. Gastrointest. Surg.* **14**, 449–461
48. Ganapathy, V., Thangaraju, M., Gopal, E., Martin, P. M., Itagaki, S., Miyauchi, S., and Prasad, P. D. (2008) *AAPS J.* **10**, 193–199
49. Frank, H., Gröger, N., Diener, M., Becker, C., Braun, T., and Boettger, T. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 24729–24737
50. Hove, H., and Mortensen, P. B. (1995) *Dig. Dis. Sci.* **40**, 320–330
51. Hove, H., Rye Clausen, M., and Brøbech Mortensen, P. (1993) *Gut* **34**, 625–629
52. He, T., Venema, K., Priebe, M. G., Welling, G. W., Brummer, R. J., and Vonk, R. J. (2008) *Eur. J. Clin. Invest.* **38**, 541–547
53. Marquet, P., Duncan, S. H., Chassard, C., Bernalier-Donadille, A., and Flint, H. J. (2009) *FEMS Microbiol. Lett.* **299**, 128–134
54. Veiga, P., Gallini, C. A., Beal, C., Michaud, M., Delaney, M. L., DuBois, A., Khlebnikov, A., van Hylckama Vlieg, J. E., Punit, S., Glickman, J. N., Onderdonk, A., Glimcher, L. H., and Garrett, W. S. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 18132–18137
55. Hove, H., and Mortensen, P. B. (1995) *Dig. Dis. Sci.* **40**, 1372–1380

3 Résultats complémentaires

Construction du mutant *S. thermophilus* Δ ldh

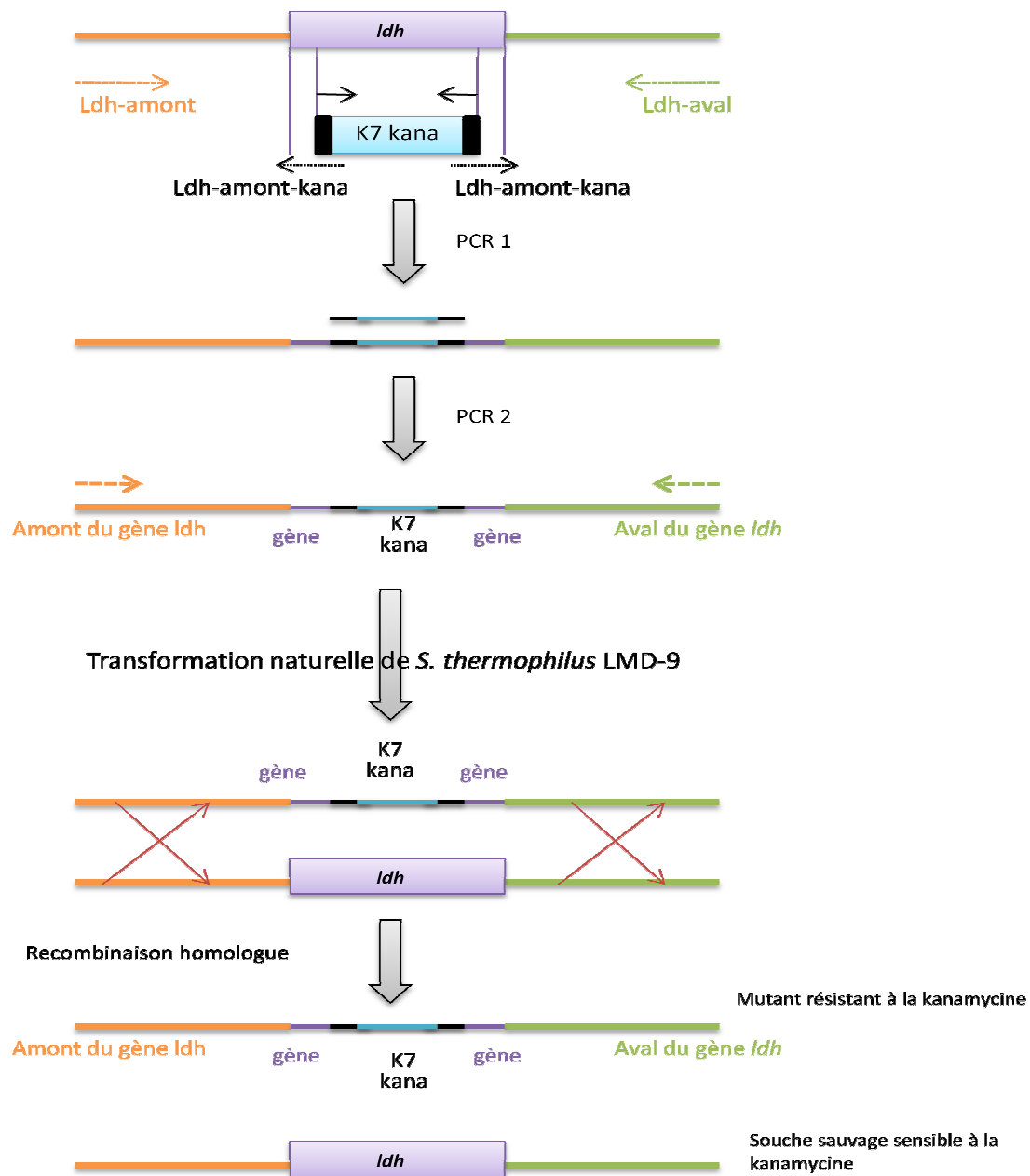
La lactate déshydrogénase (Ldh) est une enzyme clé dans le métabolisme homofermentaire de *S. thermophilus* en catalysant la réduction du pyruvate en lactate avec l'oxydation simultanée du NADH (Garvie, 1980). L'inactivation du gène codant la Ldh est une action commune à plusieurs stratégies visant à orienter les flux de carbone vers la formation de produits autres que le lactate (de Vos & Hugenholtz, 2004; Gasson *et al.*, 1996). Dans le but de dévier la production de lactate à partir du pyruvate pour produire l'acétoïne et le di-acétyl, la transformation a été réalisée en agitation afin d'oxygéner le milieu comme cela a été réalisé pour *S. diactylactis* (Bruhn & Collins, 1970). L'effet de l'aération sur la réduction de l'activité de la Ldh et sur l'induction d'utilisation d'autres voies ont été démontré pour la souche *S. thermophilus* TS2 (Smart & Thomas, 1987). En général les mutants obtenus métabolisent le glucose et produisent de l'éthanol, l'acétate, le formate, l'acétoïne et le 2,3-butanediol. Afin d'évaluer la fonctionnalité des voies d'utilisation du pyruvate et leur implication dans la formation des produits de fermentation, l'inactivation du gène a été tentée en invalidant le gène par insertion d'une cassette de résistance à la kanamycine.

3.1 Matériels et méthodes

3.1.1 Souche bactérienne, plasmide et milieux de culture

Nous avons utilisé la souche *S. thermophilus* LMD-9 (*cf* article 1). La croissance a été réalisée en milieu M17 supplémenté de 10% de lactose ou bien en milieu chimiquement défini (MCD) (Letort & Juillard, 2001) supplémenté de 10% de lactose à 28 ou 42°C. Des précultures sur la journée de *S. thermophilus* ont été réalisées en transférant une colonie isolée sur gélose M17+lactose (10%) dans 5 mL de M17+lactose. A partir de cette préculture, *S. thermophilus* estensemencé à 1% dans 5 mL de MCD. Ensuite, des suivis de croissance de cultures ensemencées à DO 0.05 à partir de ces précultures en MCD ont été réalisés en mesurant la densité optique à 600 nm. Lorsque cela était nécessaire, de l'érythromycine (2.5µg/mL) ou de la kanamycine (1000µg/mL) ont été ajoutés au milieu de culture.

3.1.2 Construction du mutant *S. thermophilus* Δ ldh



Une cassette de kanamycine a été amplifiée à partir du plasmide pJH1 (Trieu-Cuot & Courvalin, 1983) par PCR en utilisant la Phusion high fidelity DNA polymerase et ce avec les primers : AphA3-F (5' CCAGCGAACCATTGTA^{3'}) et AphA3-R (5' GTTGCGGATGTACTTCAG^{3'}). Les fragments en amont et en aval du gène *ldh* ont été amplifiés par PCR en utilisant la Phusion DNA polymerase, l'ADN de *S. thermophilus* LMD-9 a été utilisé comme matrice. Pour la partie en amont du gène *ldh* les primers utilisés sont : *ldh*-amont (5' GCGCTCACGACCTGATT^{3'}) / *ldh*-amont-kanamycine (5' AGGGGTCCCAGCGCCTACGAGGAATTTGTATCGATTAGTTTAGTTGCAGTCAT^{3'}). Pour la partie en aval du gène les primers utilisés sont: *ldh*-aval (5' AAGACATCAAACGTGTAG^{3'}) / *ldh*-aval-Kanamycine (5' CTTACCTATCACCTCAAATGGTTCGCTGGGTTTATCCTGAATTCCAAGAAGCT^{3'}). Les brins des fragments générés contiennent des séquences complémentaires: l'extrémité 3' de la partie amont du gène *ldh* contient une séquence complémentaire avec l'extrémité 5' de la cassette de kanamycine et l'extrémité 3' de la cassette de kanamycine est complémentaire avec l'extrémité 5' de la partie aval du gène *ldh* (Figure 15). Ceci permet de joindre les 3 fragments et d'amplifier le fragment généré par PCR en utilisant les primers *ldh*-amont et *ldh*-aval. Après purification avec le kit QIAquick PCR purification, 500 ng du fragment de 3.5 kb résultant sont utilisés pour transformer *S. thermophilus* LMD-9 par compétence naturelle comme décrit par Gardan *et al.* en 2009.

La transformation de *S. thermophilus* LMD-9 a été réalisée en agitation afin d'oxygéner le milieu. Les souches mutées sont sélectionnées sur gélose M17 + lactose (10%) + kanamycine.

Inactivation conditionnelle du gène *ldh*

Nous avons inséré dans le plasmide pG⁺host9 (Biswas *et al.*, 1993), qui est thermosensible et contient une résistance à l'érythromycine (Maguin *et al.*, 1992), le gène *ldh* de *S. thermophilus* LMD-9 (Figure 16). Nous avons amplifié le gène *ldh* en ajoutant des sites de restriction PstI et NotI respectivement en amont et en aval: *ldh*-PstI-amont: (5' gcaactgcagtcaccattgagccatacgaa^{3'}) et *ldh*-NotI-aval : (5' aatagCGGCCGCATGATAAAGATACTCGTAAAG^{3'}). Le fragment a ensuite été purifié avec le kit QIAquick PCR purification et double digéré par PstI et NotI et cloné dans le plasmide pG⁺host9 double digéré par PstI et NotI. *S. thermophilus* LMD-9 a été ensuite transformé par compétition naturelle (Gardan *et al.*, 2009). Les bactéries transformées (*S. thermophilus* LMD-9 pG⁺host9::*ldh*) ont été sélectionnées sur gélose M17+lactose (10%) + érythromycine. Le gène *ldh* de l'ADN chromosomique de *S. thermophilus* LMD-9 pG⁺host9::*ldh* a été ensuite

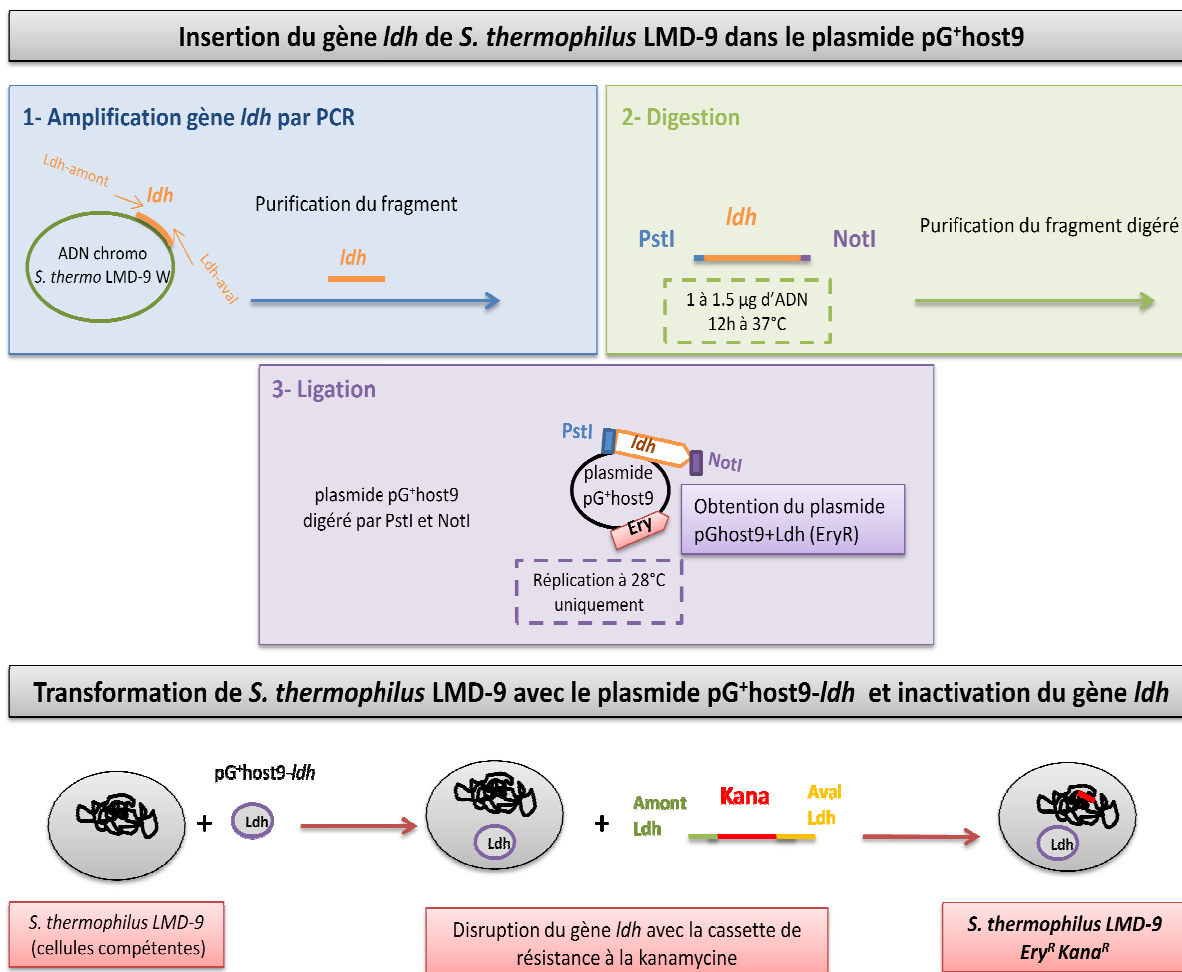


Figure 16 : Inactivation conditionnelle du gène *ldh* chez *S. thermophilus* LMD-9

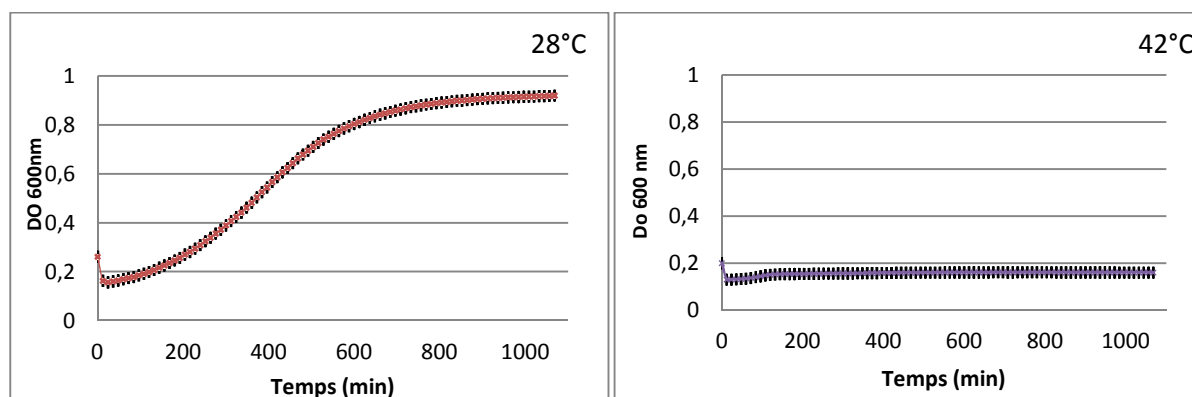


Figure 17 : Cinétique de croissance du mutant *S. thermophilus* LMD-9 *ldh* ::kana pG⁺host9 ::*ldh* à 28°C (figure à gauche) et à 42°C (figure à droite).

inactivé par insertion d'une cassette de résistance à la kanamycine comme décrit précédemment. Les bactéries transformées (*S. thermophilus* LMD-9 *ldh* ::kana pG⁺host9 ::*ldh*) ont été sélectionnées sur gélose M17+Lactose (10%) + érythromycine + kanamycine. Les bactéries *S. thermophilus* LMD-9 *ldh* ::kana pG⁺host9 ::*ldh* obtenues ont été séquencées au niveau de l'insertion de la cassette de résistance à la kanamycine pour s'assurer de l'obtention de la mutation voulue.

3.1.2 Suivi de croissance de *S. thermophilus* LMD-9 LDH *ldh* ::kana pG⁺host9 ::*ldh*

Les croissances de 3 cultures indépendantes de *S. thermophilus* LMD-9 *ldh* ::kana pG⁺host9 ::*ldh* ont été suivies à 28°C et à 42 °C par mesure de DO à 600nm.

3.2 Résultats et discussion

La transformation de *S. thermophilus* LMD-9 se fait par compétence naturelle comme décrit par Gardan et ses collaborateurs (Gardan *et al.*, 2009). Malgré nos essais de transformation en aérobiose et en anaérobiose, nous n'avons pas réussi à obtenir le mutant. Nous avons avancé l'hypothèse que l'inactivation du gène *ldh* pourrait être létale pour *S. thermophilus* comme cela a été déjà proposé (Hols *et al.*, 2005).

Pour confirmer cela, nous avons réalisé une inactivation conditionnelle du gène *ldh* en insérant le plasmide pG⁺host9, qui est thermosensible et contient une résistance à l'érythromycine. Le figure 17 montrent les cinétiques de croissance du mutant *S. thermophilus* LMD-9 *ldh* ::kana pG⁺host9 ::*ldh* respectivement à 28°C et 42°C. A 28°C, le plasmide pG⁺host9 où nous avons inséré le gène *ldh* se réplique. Cela explique la croissance observée à 28°C. A 42°C, nous n'observons pas la croissance de *S. thermophilus* LMD-9 *ldh* ::kana pG⁺host9 ::*ldh* car le plasmide pG⁺host9 ne se réplique pas à cette température. La viabilité du mutant *S. thermophilus* LMD-9 *ldh* ::kana pG⁺host9 ::*ldh* complémenté a confirmé que l'inactivation du gène *ldh* est létale probablement en raison de l'absence d'une voie alternative à la régénération du NAD⁺.

Smart et Thomas (1987) ont essayé de dévier le métabolisme de carbone chez des souches de *Streptococci* et cela en réalisant des croissances en anaérobiose ou en aérobiose (Smart & Thomas, 1987). Chez *S. thermophilus* TS2, l'aération du milieu de culture n'a pas d'effet sur les activités enzymatiques de la lactate déshydrogénase, de la NADH oxydase et ou de la pyruvate déshydrogénase. Plusieurs approches infructueuses ont conduit à la

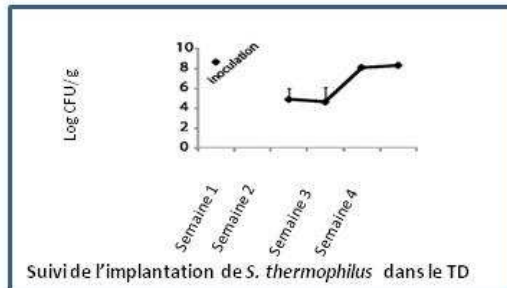
conclusion que cette inactivation est probablement létale due à l'absence d'une voie alternative pour la régénération du NAD^+ à partir du pyruvate (Hols *et al.*, 2005). D'autres approches d'invalidation de la Ldh chez *Streptococcus mutans* ont été infructueuses (Hillman *et al.*, 1996).

Inoculation de rats axéniques avec du lait fermenté avec *S. thermophilus* ($5 \cdot 10^8$ UFC/mL)

Rat (male, Fisher 344)



1. *S. thermophilus* colonise le TD et s'adapte progressivement

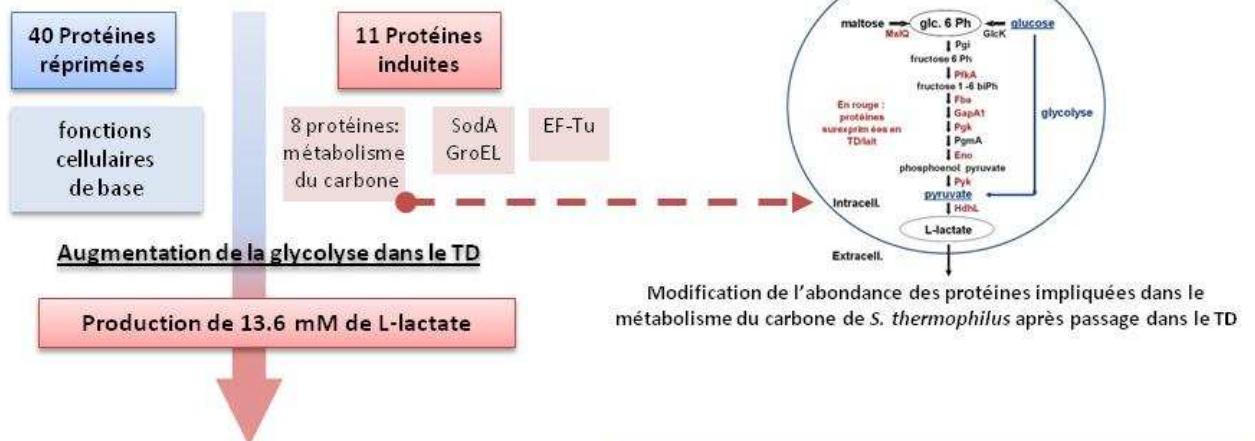


Implantation en 3 étapes:

- 1- Phase d'initiation (10^5 UFC/g de fèces)
- 2- Phase de croissance
- 3- Phase de maintenance (10^8 UFC/g de fèces)

2. *S. thermophilus* est métaboliquement actif dans le TD

Profil protéique de *S. thermophilus* après passage dans le TD



3. La présence de *S. thermophilus* LMD-9 induit les transporteurs de mono-carboxylates chez les rats Ino-LMD9 /rats axéniques

- *S. thermophilus* n'a pas d'effet sur la profondeur des cryptes
- Induction de la protéine d'arrêt du cycle cellulaire p27^{Kip1} des colonocytes



Le lactate : molécule « signal » impliquée dans l'induction de p27^{Kip1}

Figure 18 : Schéma de synthèse des principaux résultats

4 Discussion générale

Ce travail a permis d'avoir de nouvelles connaissances sur l'adaptation d'une bactérie lactique au tractus digestif et sur l'impact de sa présence sur l'hôte (Figure 18 : synthèse des principaux résultats).

En effet, la cinétique d'adaptation progressive au TD de rats axéniques observée est spécifique de *S. thermophilus*. D'autres études réalisées avec des bactéries dominantes du microbiote humain telles que *E. coli*, *B. thetaiotaomicron* et *R. gnavus* (Alpert *et al.*, 2009; Cherbuy *et al.*, 2010; Filho-Lima *et al.*, 2000) ou des bactéries lactiques telles que *L. lactis*, *L. sakei* et *L. acidophilus* (Chiaramonte *et al.*, 2009; Filho-Lima *et al.*, 2000; Roy *et al.*, 2008a) ont montré une colonisation du TD rapide (un délai de 2 à 5 jours), maximale et stable.

Lors de la colonisation du TD, *S. thermophilus* est métaboliquement actif. Après passage dans le TD, son profil protéique change par rapport à une croissance en lait. 40 protéines impliquées dans les fonctions cellulaires de base sont réprimées et 11 protéines sont induites. Dans le TD des rats, deux protéines sont peut-être induites en réponse au stress du à une sensibilité à l'oxygène ou à une variation de pH à savoir : la superoxyde dismutase (SodA) et la protéine chaperonne GroEL. Ces deux protéines sont aussi induites chez *Lactococcus lactis* en réponse au passage dans le TD de souris axéniques (Roy *et al.*, 2008b) confirmant leur induction en cas de stress *in vivo*. Une induction de ces protéines a déjà été décrite *in vitro* chez *L. lactis* (Sanders *et al.*, 1995), chez *S. thermophilus* (Andrus *et al.*, 2003; Arena *et al.*, 2006; Bruno-Barcena *et al.*) et chez *L. rhamnosus* (An *et al.*, 2011).

Huit protéines impliquées dans le métabolisme du carbone et plus particulièrement dans la voie glycolytique sont induites. Parmi ces huit protéines, l'induction de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GapA1), la 6-phosphofructokinase (PfkA) et la fructose-1,6-phosphate aldolase (ster_1876) est probablement liée à deux facteurs : la présence de H₂O₂ et la privation de lactose (Arena *et al.*, 2006).

Cette modification d'induction de protéines impliquées dans le métabolisme du carbone a aussi été observée chez d'autres bactéries après passage dans le TD de souris axéniques. Parmi les protéines induites après passage dans le TD, deux protéines sont associées à des systèmes PTS (transport de mannose et cellobiose), d'autres sont impliquées dans le catabolisme du pyruvate et dans la voie des pentoses phosphates chez *L. lactis* (Roy *et al.*, 2008b) et deux protéines similaires à celles induites chez *S. thermophilus* impliqués

dans : la réponse au stress (GroEL) et le métabolisme du carbone (6-phosphofructokinase et fructose-biphosphate aldolase) chez *L. sakei* (Chiaramonte *et al.*, 2010).

Lors du passage dans le TD de souris, *L. plantarum* adapte ses capacités pour métaboliser des sucres en induisant des gènes impliqués dans le métabolisme du carbone (Bron *et al.*, 2004) et cela selon le compartiment dans lequel il se trouve à savoir l'estomac, l'intestin grêle, le caecum et le colon (Marco *et al.*, 2007; Marco *et al.*, 2009). L'induction de ces protéines chez *L. lactis* est liée à la présence de sources de carbone fermentescibles provenant de l'alimentation des souris (Roy *et al.*, 2008b). Le passage dans le TD confère à des souches de *L. sakei* des capacités de croissances significativement plus rapides sur différentes sources de carbone telles que le fructose, ribose et galactose (Chiaramonte *et al.*, 2010). L'induction de la glycolyse semble être la conséquence de l'adaptation aux conditions du TD ainsi qu'aux nutriments qui y sont disponibles. En effet, la mutation de certains gènes impliqués dans le métabolisme du carbone chez *E. coli* affecte la colonisation du TD chez la souris (Chang *et al.*, 2004).

Chez *S. thermophilus*, l'adaptation aux conditions du TD passe par une augmentation de glycolyse et une production de lactate à une concentration de 13.6 mM. Quel serait l'effet du lactate produit sur l'hôte ?

Des transporteurs de monocarboxylates (incluant le transport du lactate) sont induits dans les cellules épithéliales coliques des rats mono-associés avec *S. thermophilus*. La présence de *S. thermophilus* dans le TD de rats Ino-LMD9 n'a pas d'effet sur la profondeur des cryptes ni sur la structure des cryptes. Ainsi, comme il a été démontré avec d'autres bactéries (*B. thetaiotaomicron*, *R. gnavus* et *Clostridium paraputrificum*), une seule bactérie ne suffit pas à stimuler la prolifération ni à augmenter la surface d'absorption de l'épithélium colique. Jusqu'à maintenant, il a été démontré au sein de notre équipe que l'inoculation d'un microbiote complexe conduit à une augmentation de la surface d'absorption en augmentant la profondeur des cryptes et en les fractionnant par un processus de fission (Cherbuy *et al.*, 2010). Cet effet d'une population microbienne complexe est associé à une modulation de plusieurs protéines du cycle cellulaires. L'induction de protéines d'arrêt du cycle cellulaire pourrait être déclenchée par une seule bactérie. En effet, la présence de *S. thermophilus* augmente la quantité de la protéine p27^{kip1} qui inhibe les cyclines kinase-dépendantes et qui joue un rôle prépondérant dans la régulation du cycle cellulaire dans le TD (Besson *et al.*, 2008). L'augmentation de la glycolyse qui découle de l'adaptation de *S.*

thermophilus aux conditions du TD est un facteur majeur dans la production de lactate qui pourrait être la molécule « signal » de la bactérie ayant un effet sur l'hôte.

Chapitre 2 : Importance du métabolisme du lactose chez *Streptococcus*
thermophilus in vivo

1 Introduction

S. thermophilus s'est adapté au lait au cours du temps par un processus de spécialisation (Goh *et al.*, 2011; Hols *et al.*, 2005). Cette adaptation s'est probablement faite par une acquisition de gènes, par une perte de gènes (environ 10%) et par l'apparition de pseudogènes (Bolotin *et al.*, 2004; Eng *et al.*, 2011; Lefebure & Stanhope, 2007). Un exemple d'adaptation est l'acquisition du gène *metC*. Il est nécessaire à la synthèse de la méthionine, acide aminé rare dans le lait, et présente 95% de similitude avec un fragment d'ADN de *L. bulgaricus*. 30% des pseudogènes de *S. thermophilus* sont impliqués dans le métabolisme carboné et la liste des gènes impliqués dans le métabolisme des sucres semble limitée (Goh *et al.*, 2011). Toutefois, *S. thermophilus* fermente cinq sucres différents à savoir le lactose, sucre utilisé préférentiellement (Goh *et al.*, 2011), le sucrose, le glucose et éventuellement le galactose et le fructose (selon les souches) (Goh *et al.*, 2011; Gunnewijk & Poolman, 2000; Van den Bogaard *et al.*, 2004; Vaughan *et al.*, 2001).

Malgré son incapacité à métaboliser de nombreux polymères de sucre prédits par l'analyse de son génome, *S. thermophilus* peut s'adapter et coloniser le tractus digestif de rats axéniques à hauteur de 10^8 UFC/g de fèces (Chapitre 1, (Rul *et al.*, 2011). Ainsi, durant les deux premières semaines de colonisation, *S. thermophilus* a probablement adapté son métabolisme aux nutriments présents dans le tractus digestif à savoir des polymères de sucres complexes (maïs, blé...) ainsi que peut être aux sucres du mucus tel que le fucose. Toutefois, *S. thermophilus* atteint un niveau de population beaucoup plus faible que *B. thetaiotaomicron* qui présente une population de 10^{10} à 10^{11} UFC/g fèces chez des animaux mono-associés (Sonnenburg *et al.*, 2006). Cette bactérie commensale exploite au mieux son atout majeur pour la colonisation : son arsenal enzymatique très important et ce afin d'utiliser les sucres et s'adapter au TD. En effet, le génome de *B. thetaiotaomicron* code pour 226 gènes prédits ou connus d'hydrolases de glycosides et 15 lyases de polysaccharides impliquées dans la libération de monosaccharides et d'oligosaccharides à partir des polysaccharides ainsi que pour 163 gènes paralogues codant pour un système d'utilisation de l'amidon (Sonnenburg *et al.*, 2006).

Le profil fermentaire restreint de *S. thermophilus* dans le TD pourrait être un facteur limitant pour l'obtention d'une colonisation à un haut niveau. Est-ce que l'apport d'un sucre métabolisable par *S. thermophilus* aurait un effet sur la colonisation du TD ? Quel serait

l'impact sur la physiologie de *S. thermophilus* s'il y a un apport de son sucre préférentiel, à savoir le lactose?

Dans le deuxième chapitre de ce manuscrit, nous nous sommes donc intéressés au rôle du métabolisme du lactose de *S. thermophilus* dans la colonisation du tractus digestif et sa physiologie dans le TD. Cette étude a fait l'objet d'un article présenté dans la suite ainsi que des résultats complémentaires.

2 Article

Importance du métabolisme du carbone chez *Streptococcus thermophilus* dans la colonisation du tractus digestif de rats gnotobiotiques

2.1 Contexte et objectifs

La fermentation du lactose en acide lactique est la fonction primaire des bactéries lactiques lors de leur utilisation en industrie. En ce sens, *S. thermophilus* LMD-9 est fortement adapté à l'utilisation du lactose, sucre majoritaire du lait. Cette bactérie transporte le lactose dans la cellule grâce à une perméase à lactose LacS qui opère comme un antiport lactose/galactose ou un symport lactose/proton (Foucaud & Poolman, 1992; Hutkins & Ponne, 1991). Toutefois, la fermentation du lactose n'est pas totale dans les produits laitiers. Il reste environ 3.6% et 4.5% de lactose respectivement dans les fromages blancs et dans le yaourt (Anses, 2008). Ainsi dans notre alimentation quotidienne, l'ingestion de *S. thermophilus* se fait généralement avec un apport de lactose.

L'objectif de ce travail est d'étudier l'effet du lactose et de la perméase à lactose sur la physiologie de *S. thermophilus* LMD-9 dans le tractus digestif de rats gnotobiotiques. Pour cela nous avons :

- i) obtenu des modèles d'animaux mono-associés avec *S. thermophilus* LMD-9 et recevant du lactose dans l'eau de boisson à hauteur de 4.5 g/L (Ino-LMD9^{+lac}) pendant l'expérimentation (30 jours). Chez ces animaux, nous avons étudié le niveau de colonisation du TD par *S. thermophilus*, son profil métabolique et la production de lactate dans le colon ;
- ii) construit un mutant *S. thermophilus* $\Delta lacS$ en inactivant la perméase à lactose. La croissance de cette souche mutante a été étudiée *in vitro* et *in vivo* chez des animaux mono-associés recevant du lactose.
- iii) étudié la réponse de l'hôte, plus particulièrement au niveau des transporteurs de monocarboxylates et des protéines du cycle cellulaire.

2.2 Méthodes

Nous avons construit un mutant *S. thermophilus* $\Delta lacS$ en invalidant la perméase à lactose LacS (insertion d'une cassette de résistance à la kanamycine par compétence naturelle). Les croissances du mutant et de la souche sauvage de *S. thermophilus* ont été

caractérisées *in vitro* en présence de différentes sources de carbone (lactose, glucose, sucrose et fructose). Des modèles d'animaux mono-associés avec *S. thermophilus* $\Delta lacS$ et sauvage ont été obtenus et nous avons étudié la colonisation du TD de ces deux souches en présence ou non de lactose dans l'eau de boisson à 45g/L.

L'activité métabolique de *S. thermophilus* *in vivo* ainsi que son profil protéique ont été étudiés par un dosage de lactate (produit final de la fermentation) et une analyse protéomique comparative bidimensionnelle des protéines cytoplasmiques avec et sans apport de lactose.

Nous nous sommes intéressés ensuite à l'étude de l'effet de *S. thermophilus* sur l'hôte au niveau des cellules épithéliales coliques. Nous avons observé l'aspect de cet épithélium et étudié l'induction des transporteurs de mono-carboxylates SLC16A1, SLC16A2 et SLC5A8 par RT-qPCR ainsi que la protéine d'arrêt cellulaire p27^{kip1} par Western blot.

2.3 Principaux résultats

- L'apport de lactose à 45 g/L dans l'eau de boisson des rats:

i) stimule la colonisation du TD par *S. thermophilus* qui se stabilise à hauteur de 10^9 UFC/g de fèces. En comparant les animaux recevant ou non du lactose, nous avons également observé que le lactose induit une colonisation rapide dès le moment du gavage, alors qu'une phase d'adaptation est nécessaire en absence de lactose (cf chapitre 1).

ii) induit 16 protéines impliquées dans le métabolisme du carbone ce qui représente le double de protéines induites en comparaison à des animaux mono-associés sans apport de lactose. Ainsi, la glycolyse de *S. thermophilus* qui est déjà élevée sans apport de lactose l'est encore plus en présence de lactose.

iii) conduit à la production de L-lactate à hauteur de 49mM dans le contenu caecal, soit 3.7 plus que chez les animaux mono-associés avec *S. thermophilus* LMD-9 sans apport de lactose.

- La comparaison de la croissance *in vitro* de *S. thermophilus* et de *S. thermophilus* $\Delta lacS$ en présence de différents sources de carbone a permis de montrer l'incapacité du mutant à utiliser le lactose.

- L'absence de la perméase à lactose LacS ralentit la colonisation du TD les premiers jours par *S. thermophilus* $\Delta lacS$. Toutefois, après de 15 jours le mutant atteint le même niveau de population que la souche sauvage à savoir 10^9 UFC/g de fèces.

- Au niveau de l'épithélium colique, les ARNs messagers codant les transporteurs de mono-carboxylates SLC16a1 et SLC5a8 sont induits chez des rats mono-associés avec *S. thermophilus* par rapport à des rats axéniques (les facteurs d'induction étant respectivement de 1.8 et 1.6). La colonisation par *S. thermophilus* n'a pas d'effet sur la morphologie des cryptes mais elle induit la production d'une protéine du cycle cellulaire p27^{kip1} d'un facteur 1.8 en comparaison avec des rats axéniques. Les proportions d'induction sont du même ordre que celles obtenues chez les rats mono-associés sans apport de lactose.

2.4 Conclusion

Cette étude nous confirme la flexibilité de la physiologie de *S. thermophilus* et de son adaptation au TD. Elle nous a aussi permis de montrer que le lactose est un facteur limitant de la colonisation du TD et que l'activation des enzymes impliquées dans le métabolisme des sucres constitue la signature de *S. thermophilus* dans le TD. En effet, l'apport de lactose dans l'eau de boisson montre l'impact de cette source de carbone à la fois sur l'augmentation du niveau de colonisation du TD à 10⁹ UFC/g de fèces, la stimulation de l'induction des protéines impliquées dans la glycolyse et sur l'augmentation de la production de L-lactate dans le TD à 49 mM.

Dans le but d'étudier le rôle du lactose sur la physiologie de *S. thermophilus*, la perméase à lactose LacS de *S. thermophilus* a été invalidée. Le mutant *S. thermophilus* Δ lacS présente une période d'adaptation au TD plus longue que la souche sauvage mais finit par atteindre le même niveau de colonisation finale. Cela suggère que la perméase LacS joue un rôle dans l'adaptation au TD mais son invalidation n'affecte pas le niveau de colonisation finale sans doute car il y a des mécanismes d'adaptation.

Le taux de lactate produit dans le caecum est de 30 mM et 34.1 mM, respectivement, chez le mutant et la souche sauvage, ce qui confirme une forte activité glycolytique même chez le mutant.

Du côté de l'hôte, la colonisation de *S. thermophilus* s'accompagne d'une induction des transporteurs de monocarboxylates et la protéine d'arrêt du cycle cellulaire p27^{kip1}. Malgré une production de lactate plus importante chez les rats mono-associés avec *S. thermophilus* ayant reçu du lactose (presque 4 fois plus) par rapport aux rats mono-associés avec *S. thermophilus*, l'induction des transporteurs de monocarboxylates et la protéine

d'arrêt du cycle cellulaire $p27^{kip1}$ restent du même ordre de grandeur. Ces similitudes de niveaux de l'induction entre les deux lots de rats Ino-LMD9^{+lac} et Ino-LMD9 montrent vraisemblablement une homéostasie au niveau de l'intestin.

2.5 Participation à la réalisation de cette étude

Dans ce travail, je me suis intéressée à l'effet du lactose sur la physiologie de *S. thermophilus* et particulièrement sur la production de lactate. Ensuite, j'ai étudié l'effet de l'apport d'une source de carbone sur la réponse de l'hôte.

Afin de modifier le métabolisme du carbone, j'ai construit un mutant *S. thermophilus* $\Delta lacS$ en invalidant la perméase à lactose. Puis, j'ai comparé la croissance du mutant et de la souche sauvage sur différentes sources de carbone *in vitro* afin de distinguer l'utilisation des sucres. J'ai donc bien vérifié que la souche mutée n'utilise pas le lactose *in vitro*.

J'ai ensuite étudié le rôle de la perméase à lactose dans la colonisation du TD lors des expériences *in vivo*. J'ai obtenu des animaux gnotobiotiques. J'ai suivi la colonisation du TD par *S. thermophilus* $\Delta lacS$ de rats gnotobiotiques qui ont reçu du lactose à 45 g/L dans l'eau de boisson durant 4 semaines. Puis j'ai mesuré l'activité métabolique de ce mutant en dosant le lactate produit dans le contenu caecal et les fèces des rats.

J'ai aussi contribué à l'étude de la réponse de l'hôte suite à la colonisation du TD par *S. thermophilus*. Plus précisément, j'ai comparé l'induction des transporteurs de monocarboxylates (SLC16a1, SLC16a2 et SLC5a8) au niveau des cellules épithéliales coliques entre rats axéniques et rats mono-associés avec *S. thermophilus*.

Pour ce travail, j'ai participé à la rédaction de l'article (matériel et méthodes : construction du mutant *S. thermophilus* $\Delta lacS$).

Carbohydrate Metabolism Is Essential for the Colonization of *Streptococcus thermophilus* in the Digestive Tract of Gnotobiotic Rats

Muriel Thomas^{1*}, Laura Wrzosek¹, Leila Ben-Yahia¹, Marie-Louise Noordine¹, Christophe Gitton², Didier Chevret³, Philippe Langella¹, Camille Mayeur¹, Claire Cherbuy¹, Françoise Rul^{2*}

1 Commensal and Probiotics-Host Interactions Laboratory, INRA, UMR1319 Micalis, Jouy-en-Josas, France, **2** Peptides and Bacterial Communication Laboratory, INRA, UMR1319 Micalis, Jouy-en-Josas, France, **3** PAPPPO (Plateforme d'Analyse Protéomique de Paris Sud-Ouest) proteomic platform, INRA, UMR1319 Micalis, Jouy-en-Josas, France

Abstract

Streptococcus thermophilus is the archetype of lactose-adapted bacterium and so far, its sugar metabolism has been mainly investigated *in vitro*. The objective of this work was to study the impact of lactose and lactose permease on *S. thermophilus* physiology in the gastrointestinal tract (GIT) of gnotobiotic rats. We used rats mono-associated with LMD-9 strain and receiving 4.5% lactose. This model allowed the analysis of colonization curves of LMD-9, its metabolic profile, its production of lactate and its interaction with the colon epithelium. Lactose induced a rapid and high level of *S. thermophilus* in the GIT, where its activity led to 49 mM of intra-luminal L-lactate that was related to the induction of mono-carboxylic transporter mRNAs (SLC16A1 and SLC5A8) and p27^{Kip1} cell cycle arrest protein in epithelial cells. In the presence of a continuous lactose supply, *S. thermophilus* recruited proteins involved in glycolysis and induced the metabolism of alternative sugars as sucrose, galactose, and glycogen. Moreover, inactivation of the lactose transporter, LacS, delayed *S. thermophilus* colonization. Our results show i/that lactose constitutes a limiting factor for colonization of *S. thermophilus*, ii/that activation of enzymes involved in carbohydrate metabolism constitutes the metabolic signature of *S. thermophilus* in the GIT, iii/that the production of lactate settles the dialogue with colon epithelium. We propose a metabolic model of management of carbohydrate resources by *S. thermophilus* in the GIT. Our results are in accord with the rationale that nutritional allegation *via* consumption of yogurt alleviates the symptoms of lactose intolerance.

Citation: Thomas M, Wrzosek L, Ben-Yahia L, Noordine M-L, Gitton C, et al. (2011) Carbohydrate Metabolism Is Essential for the Colonization of *Streptococcus thermophilus* in the Digestive Tract of Gnotobiotic Rats. PLoS ONE 6(12): e28789. doi:10.1371/journal.pone.0028789

Editor: Daniel Tomé, Paris Institute of Technology for Life, Food and Environmental Sciences, France

Received: September 5, 2011; **Accepted:** November 15, 2011; **Published:** December 22, 2011

Copyright: © 2011 Thomas et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was financially supported by Syndifrais-CNIEL (Syndicat National des Fabricants de Produits Frais/Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière) (Paris, France) (<http://www.cniel.com/quifait/Syndicat/SYNDIFRAI/syndifr.html>). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. No additional external funding has been received for this study.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: muriel.thomas@jouy.inra.fr (MT); francoise.rul@jouy.inra.fr (FR)

Introduction

Streptococcus thermophilus (*S. thermophilus*) is a dairy bacterium consumed by Humans for centuries. *S. thermophilus* is in the European Qualified Presumption of Safety list of food bacteria and is a generally recognized as a safe species (GRAS status); it has a long documented history of safe use in food and its genome is devoided of potential virulence functional genes [1,2]. *S. thermophilus* is found in numerous cheeses and is one of the two bacteria in yogurt with its obligate partner *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* (*L. bulgaricus*). Its high performance in fermenting milk and its resistance to elevated temperatures are two essential properties that accounted for a large utilization of strains of the species *S. thermophilus* in dairy industry. In addition, *S. thermophilus* is also recognized as a probiotic and, therefore, used to promote health [3,4,5,6].

Recently, a general claim on yogurt on aiding lactose digestion has been accepted by the European Food Safety Authority. The latter considers that a cause and effect relationship is established between the consumption of live yogurt culture and improvement of lactose digestion in individuals with lactose mal-digestion (EFSA

journal, 2010). In Humans, only a low proportion of population retains the capacity to degrade the lactose into adulthood, because the intestinal enzyme lactase-phlorizin hydrolase (more often called lactase or β -galactosidase) activity commonly starts decreasing after the first months or years of life [7,8]. The benefits of yogurt are mainly linked to the metabolic capacities of *L. bulgaricus* and *S. thermophilus* that compensate the deficiency of the intestinal enzymes by their own β -galactosidase [9,10,11]. Our recent work brings concordant data about the preponderant role of metabolic adaptations of *S. thermophilus* in the gastrointestinal tract (GIT) of gnotobiotic rats. Previously, we have shown that *S. thermophilus* adapts its physiology to GIT by enhancing proteins devoted to carbohydrates metabolism [12]. It is likely that the overall glycolytic metabolic capacity of *S. thermophilus* is boosted in the GIT, thus explaining how the consumption of this viable microorganism may help the digestion of carbohydrates [9,12]. In yogurt at the end of fermentation process, there is a significant amount of lactose (4–5%) [8,13]. Thus, it could be hypothesized that residual lactose present in yogurt may be deleterious for lactose intolerant individuals; however, the inverse has been observed. The residual lactose in yogurt can be considered as a

prebiotic for people with lactose mal-digestion [14,15,16]. The main mechanisms involved are linked to the adaptation of microbiota activity/composition in the presence of lactose, as illustrating by an enhanced faecal β -galactosidase activity [10,15]. Concordantly, in gnotobiotic rats, β -galactosidase activity of *S. thermophilus* is higher in the GIT after lactose supplementation [17]. Thus the lactose-related metabolism of viable bacteria present in a final dairy product, and their transit throughout the GIT, is central to better understanding the beneficial effects of fermented products on health [18].

Although *S. thermophilus* can metabolize a number of different sugars (sucrose, glucose, fructose), lactose remains its favorite substrate. Lactose transport, metabolism, and regulation have been extensively studied *in vitro* by using different strains of *S. thermophilus* [19,20] and in regard to their genomic sequences [21,22]. In *S. thermophilus*, lactose is transported into the cell *via* the LacS permease which operates as a lactose/galactose antiporter or as a galactoside/H⁺ symporter [23]. LacS activity leads to the release of galactose into the extracellular medium after β -galactosidase has hydrolysed lactose into glucose and galactose. On the one hand, *S. thermophilus* is the archetype of lactose-adapted bacterium and on the other hand, we have observed that this specialized bacterium revealed a high adaptability of its carbohydrate metabolic pathways to the gut environment [12]. To this end, the objective of this work was to study the impact of lactose and lactose permease on *S. thermophilus* physiology in the GIT of gnotobiotic rats. We studied the sequenced strain LMD-9 for its colonization capacities, lactate production, proteomic profile and the related host responsiveness when animals received 4.5% of lactose that corresponded milk content of lactose. This work sheds new light on the lactose-related metabolism of *S. thermophilus* in the GIT and the subsequent crosstalk with colonic epithelium. By comparing the wild-type *S. thermophilus* strain and a mutant strain inactivated in lactose permease LacS, we also studied the involvement of its transporter in the carbohydrate metabolism *in vitro* and *in vivo*. Our results led us to propose a metabolic model of management of carbohydrates resources by *S. thermophilus in vivo*.

Results

Colonization and metabolic activity of *S. thermophilus* in the GIT and effects on colon epithelium

Germ free rats were orally inoculated with 6×10^8 CFU of *S. thermophilus* LMD-9 and received lactose (4.5% wt/vol) in the drinking water (Ino-LMD9^{+lac}) (Fig. 1). *S. thermophilus* was present along the GIT with an increasing amount of bacteria from the ileum to the colon (Fig. 1A). The maximum level of colonization for *S. thermophilus* occurred within the first week after gavage and this was also observed with another strain of *S. thermophilus*, LMG18311 strain (Ino-LMG18311^{+lac}) (Fig. 1B). This rapid and high level of colonization was in sharp contrast with the progressive and lower final colonization observed when *S. thermophilus* was inoculated in rats that did not receive lactose (Fig. 1C) and [12].

L-lactate - an end product of *S. thermophilus* metabolism - accumulated at a 49.9 ± 5.7 mM concentration in Ino-LMD9^{+lac} caecal content, that represented 20 fold higher L-lactate than in GF^{+lac} (2.5 ± 1.5 mM). D-lactate was not detected in all groups of rats assessed. In parallel to this luminal L-lactate accumulation, a significant ($p < 0.05$) acidification was noted with a luminal pH of 6.5 ± 0.1 in Ino-LMD9^{+lac} when compared to 7.4 ± 0.5 in GF^{+lac}. In Ino-LMG18311^{+lac}, 55.8 ± 4.2 mM L-lactate accumulated in caecal content. Thus, *S. thermophilus* - either LMD-9 or LMG18311 strain -

when colonizing the GIT was metabolically active by producing a high amount of L-lactate.

The global structure of Ino-LMD9^{+lac} epithelium was analysed by HES staining (Fig. 2A). The mean depth of colon crypt in Ino-LMD9^{+lac} was 206 ± 9 μ m that was not statistically different from values obtained with Ino-LMG18311^{+lac} (221 ± 4 μ m), GF^{+lac} (204 ± 17 μ m) and GF [24]. As illustrated, colon epithelium of Ino-LMD9^{+lac} was characterized by large and slack crypts and by the presence of crypts which seems to be ready to split (crypt fission). This global aspect of epithelium was reminiscent of our previous observations with various mono-associated and germ free rats [24]. We have previously proposed that lactate production from the metabolic activity of *S. thermophilus* stimulates an increases in monocarboxylic acid transporters mRNAs (SLC16A1 and SLC5A8) and a lactate-sensitive protein involved in the cell cycle arrest (p27^{kip1}) in colon [12]. SLC16A1 and SLC5A8 mRNAs were respectively $1.8 (\pm 0.05)$ and $1.6 (\pm 0.3)$ induced in Ino-LMD9^{+lac} ($n = 5$) relative to GF^{+lac} ($n = 3$). p27^{kip1} protein was $1.8 (\pm 0.03)$ induced in Ino-LMD9^{+lac} in comparison with GF^{+lac} (Fig. 2B), thus confirming that lactate may serve as a biological signal to communicate with host epithelium.

The sugar utilisation of *S. thermophilus* is preferentially induced *in vivo*

We compared the proteomic profiles of *S. thermophilus*, by bi-dimensional electrophoresis, after growth in milk (inoculum solution) and after 30 days residence in the GIT (faeces of Ino-LMD9^{+lac}) (Figure S1). Sixty-three proteins displayed different abundances between the 2 conditions: 25 were up-regulated (induction from 2 to 12 fold) and 38 were down-regulated (repression from 2 to 10 fold) in faeces compared to milk (Table 1).

Down-regulated proteins were mainly involved in transcription, translation, nitrogen metabolism (AA biosynthesis, peptidases), and purine and pyrimidine metabolisms. Thus, the *S. thermophilus* population was maintained at a high level (10^9 CFU/g) in the GIT even with a low expression level of these pathways, whereas its growth in milk required a high expression and availability of these enzymes.

Sixteen out of twenty-five proteins up-regulated in Ino-LMD9^{+lac} faeces, compared to milk alone, belong to the carbohydrate metabolism (Figure S1 and Table 1). Of these 16 proteins, five were glycolytic enzymes (PfkA, Fba, GapA1, Eno, Pyk) while the others were “upstream” enzymes, (leading to the formation of compounds feeding the glycolytic pathway) and “downstream” enzymes (dissipating the ultimate product of glycolysis, pyruvate). Interestingly, enzymes potentially involved in metabolism of glycogen (GlgP, MalQ), sucrose (PtsK, ScrB), galactose (GalT, GalE), maltose (MalQ) or in polysaccharide synthesis (GalE) were significantly more abundant in the GIT than in milk (Figure S1). In comparison with a culture in milk, *S. thermophilus*^{+lac} diversified its carbon source utilization by inducing the metabolism of alternative sugars in the GIT.

The presence of lactose strengthens the sugar utilisation *in vivo*

To study the effect of lactose on metabolic pathway of *S. thermophilus*, we compared two sets of data: i) Primarily listing the proteins differentially expressed in the Ino-LMD (without lactose) digestive tract *versus* milk and ii) a second listing of proteins differentially expressed in the Ino-LMD9^{+lac} digestive tract *versus* milk (Fig. 3). As soon as *S. thermophilus* was growing in the digestive tract, a large amount of proteins were down-regulated (38 and 41, in presence or absence of lactose, respectively). Thirty four of these

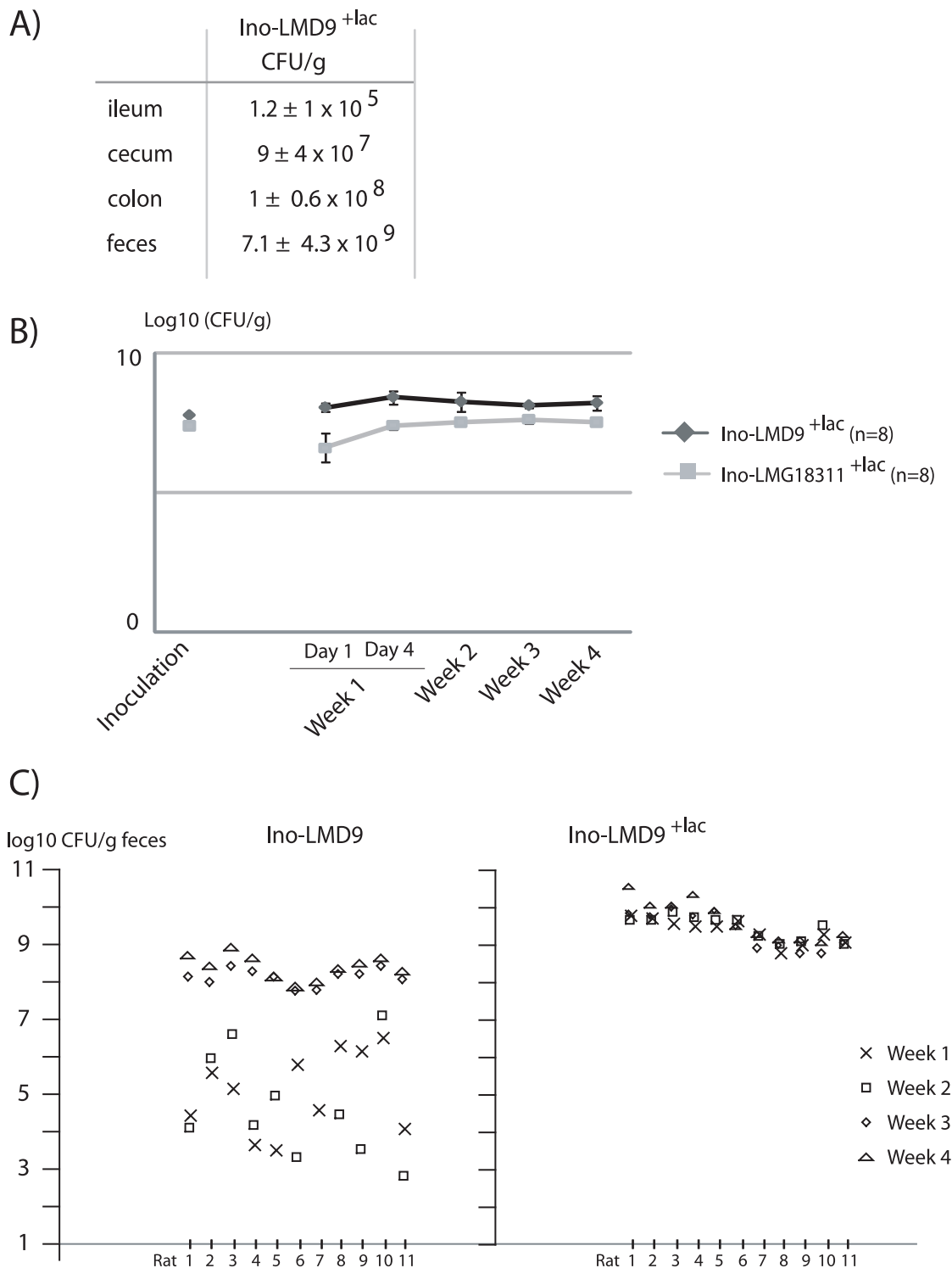


Figure 1. Colonization of *S. thermophilus* in mono-associated rats. One ml of *S. thermophilus* LMD-9 strain (6×10^8 CFU) was inoculated in germ free rats thus leading to Ino-LMD9^{+lac} rats, which received water with lactose (4.5% wt/vol). Counts of *S. thermophilus* were obtained by plating on M17 agar lactose the luminal content from ileum, caecum, colon, faeces of Ino-LMD9^{+lac} (n=11) rats 30 days after the inoculation. B) Log 10 CFU/g of *S. thermophilus* LMD-9 and LMG18311 counted from faecal samples all along the experiment for each mono-associated rat. The colonization curves obtained with LMG18311 and LMD-9 were not significantly different (p=0.4). C) Comparison of colonization profile of LMD-9 when rats received lactose (Ino-LMD9^{+lac}) or not [Ino-LMD9, data from our previous work [12]]. Each column symbolized one rat and X, □, ◇, △ represented means of *S. thermophilus* LMD-9 counts obtained from faecal samples recovered, respectively, during the first, second, third and fourth week.
doi:10.1371/journal.pone.0028789.g001

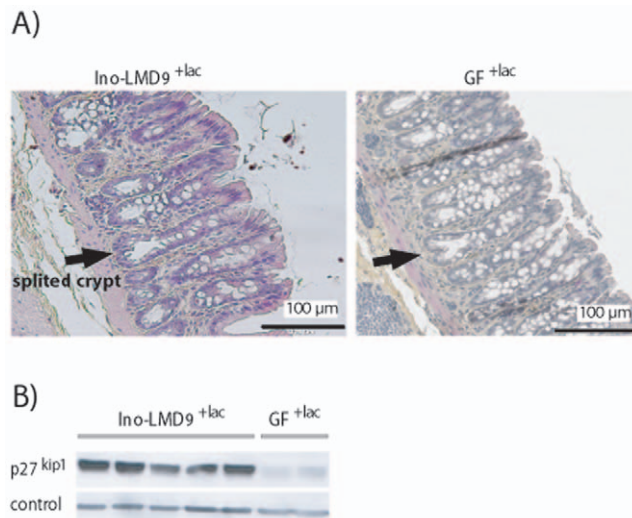


Figure 2. Colon epithelium of Ino-LMD9^{+lac}. A) Representative photomicrograph represents a slide of a colon crypt from Ino-LMD9^{+lac} and GF^{+lac} stained with HES. The arrow represented crypt fission. B) Representative Western blot detected p27^{kip1} and a loading control (GAPDH). The total proteins of colon epithelium were from Ino-LMD9^{+lac} (n = 5) and GF^{+lac} (n = 2).
doi:10.1371/journal.pone.0028789.g002

intestine-repressed proteins that were both repressed in presence or absence of lactose (Fig. 3) were involved in staple functions as transcription and translation. These results confirmed that a low level of these proteins was sufficient to allow *S. thermophilus* to grow in the GIT and establish a metabolically active population.

Of the intestine-boosted proteins, 7 were involved in glycolysis and over-expressed either in the presence or in the absence of lactose (Fig. 3). General- (DnaK, GroEL) or oxidative-stress proteins (SodA) as well as the elongation factor Tuf –also potentially involved in adhesion/colonization– were more abundant in the GIT than in milk suggesting that they are related to environmental signal responses [11].

In the presence of lactose, 9 supplementary proteins involved in carbohydrate metabolism were over-expressed in the digestive tract (Fig. 3). The presence of lactose allowed *S. thermophilus* to enhance and diversify the metabolism of diverse carbohydrate sources, potentially explaining how the population of *S. thermophilus* overwhelms 10 fold the implanted population in absence of lactose (Fig. 1C). Based on the colonization curve, the proteomic signature and the resultant lactate end-product, the mobilization of the

carbohydrate metabolism is determinant and limiting step for the colonization, the growth and the activity of *S. thermophilus* *in vivo* (Fig. 4).

Effect of lactose permease LacS inactivation on the *S. thermophilus* metabolism

In *S. thermophilus*, lactose is transported into the cell *via* the LacS permease which operates mainly as a lactose/galactose antiporter. Considering the central role of *S. thermophilus* carbohydrates metabolism *in vivo*, a negative mutant for the *lacS* gene was generated by inserting a kanamycine resistance cassette in the *lacS* gene. The resulting $\Delta lacS$ strain was validated *in vitro*, since it did not grow in the presence of lactose in contrast to the wild-type LMD-9 strain (Fig. 5A). In the presence of glucose, sucrose or fructose, $\Delta lacS$ and the wild-type LMD-9 strains displayed similar growth rates. *In vitro*, the inactivation of LacS permease impaired the growth in presence of lactose, while preserving the capacity of utilising other carbon sources.

The $\Delta lacS$ strain was then challenged *in vivo* for its capacity to colonize the GIT in germ-free rats receiving 4.5% lactose (Ino- $\Delta lacS^{+lac}$ rats). The final level of colonization was identical with $\Delta lacS$ and LMD-9 strains, with 1.5×10^9 CFU/g (Fig. 5B). Concordantly, the final amount of faecal lactate was identical in both lots of rats (30 ± 0.5 mM in Ino- $\Delta lacS^{+lac}$ versus 34.1 ± 7 mM in Ino-LMD9^{+lac}). However, the kinetic of colonisation was altered with $\Delta lacS$ strain in the first days after inoculation as the maximal colonization $\Delta lacS$ being delayed in comparison with the wild-type strain. In concordance with this delayed colonisation, the L-lactate was undetectable in the first days after inoculation in Ino- $\Delta lacS^{+lac}$ faeces, whereas it was already high (41 ± 12 mM) in faeces of Ino-LMD9^{+lac}. These results indicated that LacS permease inactivation delayed the colonisation of *S. thermophilus* and suggested that an adaptation process occurred during the first 15 days after inoculation.

Discussion

Our study demonstrates that the presence of lactose enhanced the fermentative activity of *S. thermophilus* leading to higher level of luminal lactate ($\times 3.5$ caecal lactate in Ino-LMD9^{+lac} compared to Ino-LMD9 [12]) which subsequent acts to modulate the host epithelium. Therefore, activation of enzymes involved in carbohydrate metabolism constitutes the metabolic signature of *S. thermophilus* in the GIT and allows the dialogue with colon epithelium. Lactose boosted the *S. thermophilus* carbohydrates metabolism that is already high in the digestive tract. *S. thermophilus*, probably because of its intensive use in dairy industry,

Table 1. Functional distribution of *S. thermophilus* LMD-9 proteins whose abundance changed between the milk inoculum used for gavage and the faeces of Ino-LMD9^{+lac} rats (2-DE analysis).

	Functional category (number of proteins)	Range of modulation
25 up-regulated proteins in the digestive tract	-Carbohydrate metabolism: 16 -Stress and fitness factors: 4 -Nitrogen metabolism: 2 -Nucleotide metabolism: 3	2.1–10.6 2.8–12.6 2.8–4.6 2.2–4.1
38 down-regulated proteins in the digestive tract	-Transcription/translation: 17 -Diverse: 9 - Nitrogen metabolism: 6 - Nucleotide metabolism: 5 -Carbohydrate metabolism: 1	2–10 2.2–10 2.5–5 2.5–10 2

doi:10.1371/journal.pone.0028789.t001

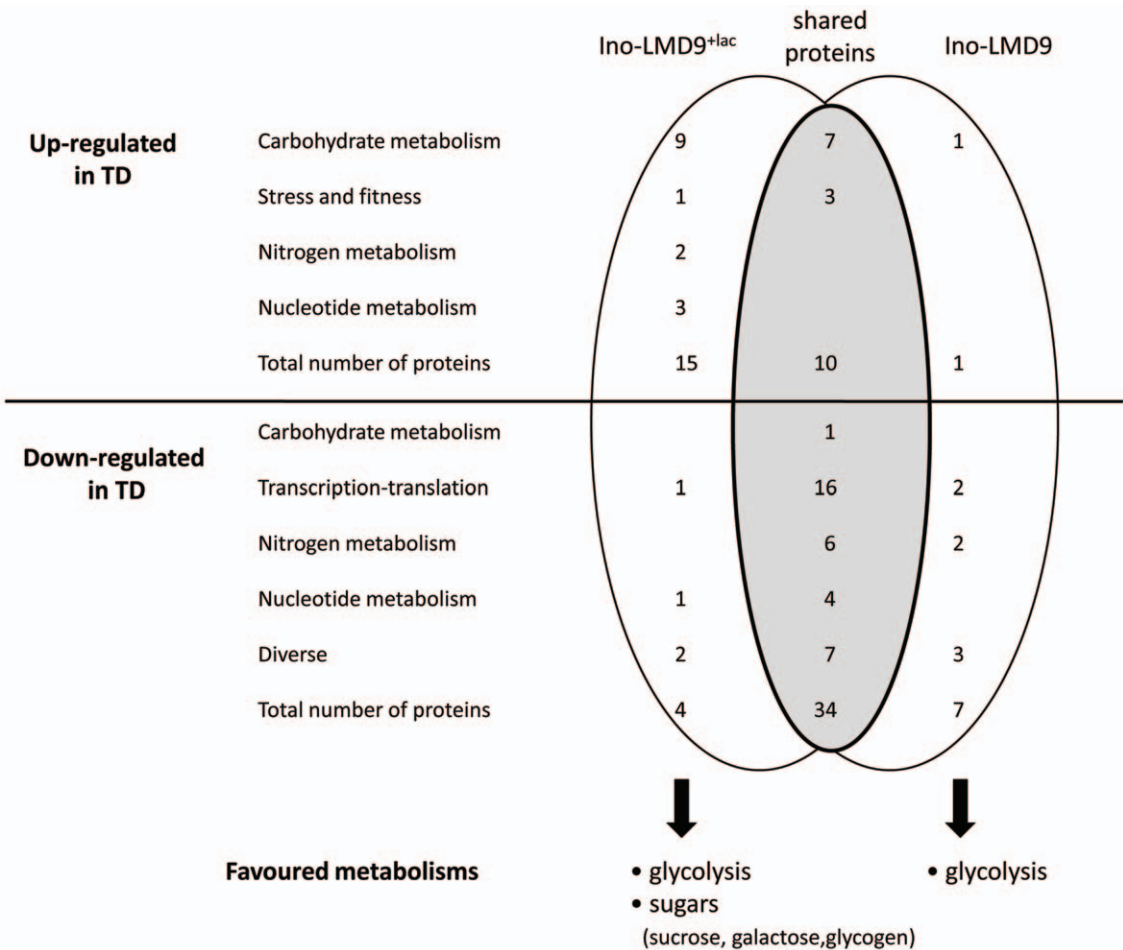


Figure 3. Comparative proteomic analysis (2-DE) of *S. thermophilus* LMD-9. Cytoplasmic extracts of *S. thermophilus* LMD-9 after passage through the GIT (Ino-LMD9^{+lac} rats) were compared with those obtained in milk culture (inoculum for gavage). Data obtained in absence of lactose (Ino-LMD9) were previously described [12]. doi:10.1371/journal.pone.0028789.g003

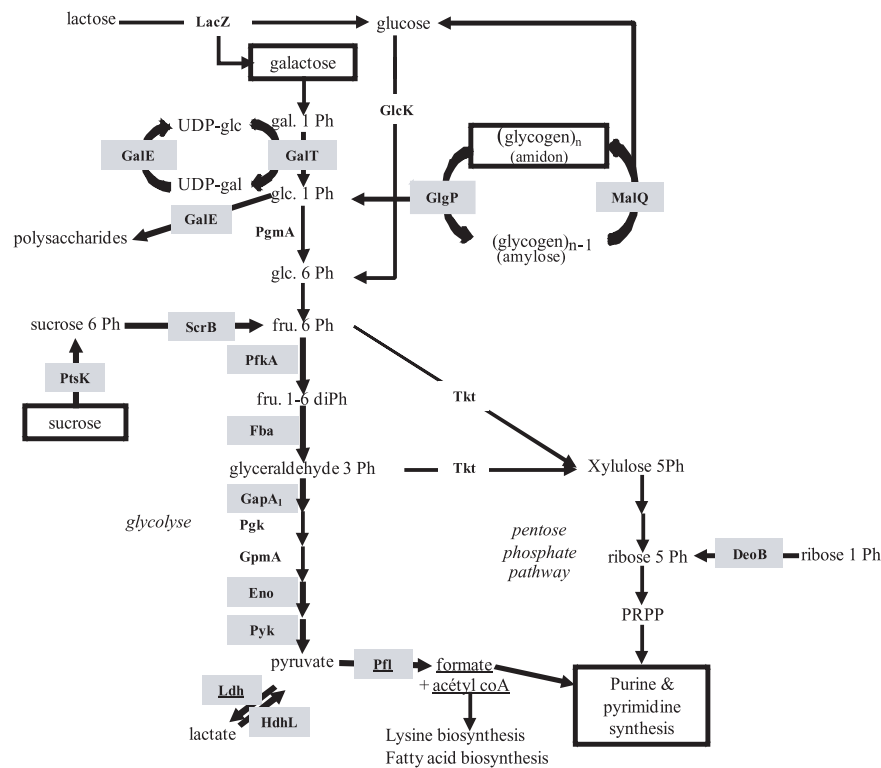
has evolved by a specialization to lactose degradation with a genome that is considered as “poor”, having lost many genes. The sugar metabolism appears here to have key functions in adaptation to the GIT environment since life cycle of *S. thermophilus* in the GIT relies on carbon metabolism.

Recently, it has been shown that the efficiency of carbohydrates consumption by bifidobacteria correlated with their ability to protect host against infection [25]. From indigenous gut microbiota to sub-abundant transient species, the carbohydrate metabolism is central for bacterial colonization, activity and subsequent dialogue with host [26,27,28,29,30]. Although *S. thermophilus* is rather specialized in the degradation of simple sugars and belongs to numerically minor group of microbiota [31], its carbohydrate metabolism is also prevalent in regulating its own adaptation in GIT and its dialogue with host.

The present work confirmed our previous data stating that lactate produced in Ino-LMD9 by *S. thermophilus* induced both mRNAs SLC16A1/SLC5A8 monocarboxylic transporters and a cell-cycle arrest protein p27^{kip1} [12]. The levels of induction between Ino-LMD9^{+lac} and GF^{+lac} were not statistically different to that obtained between Ino-LMD9 and GF [12], indicating that the 3.7 fold highest content of lactate in Ino-LMD9^{+lac} (compared to Ino-LMD9) did not correlate with higher stimulation of epithelial transporters and p27^{kip1}. All these results highlight the

homeostatic responsiveness of the epithelium, as we have previously observed after intestinal resection [32]. In mono-associated rats, it is likely that a small portion of lactate was shuttled inside colonic cells, while the remaining luminal lactate was excreted in faeces (49.9±5.7 mM caecum versus 34.1±7 mM in faeces). In such models, the major proportion of lactate was excreted, because of the absence of other bacteria that normally inhabit the gut and metabolize lactate. In healthy human adults, lactate produced by gut microbiota is nearly undetectable in faecal samples since it is absorbed by host and also consumed by lactate-utilizing bacteria to produce mainly butyrate [33,34,35,36]. Therefore, one can suppose that, in a context of a complex microbiota, *S. thermophilus* could contribute to microbial ecosystem by favoring lactate-utilizing enzymes or inhibiting low-pH sensitive bacteria [6].

Our study presents data on *S. thermophilus* physiology and demonstrates the flexibility of this bacterium to adapt to digestive environmental constraints and its capacity to diversify the use of alternative sugars. In absence of lactose, *S. thermophilus* develops a capacity to use alternative sugars *in vivo* and this suggests that similar mechanisms occurred in the absence of a functional LacS permease. The presence of lactose enhanced LMD-9 colonization in the GIT, probably by favoring the use of diverse sugars in the GIT *via* the induction of metabolisms of galactose, sucrose,

A/ Ino-LMD9^{+lac}

B/ Ino-LMD9

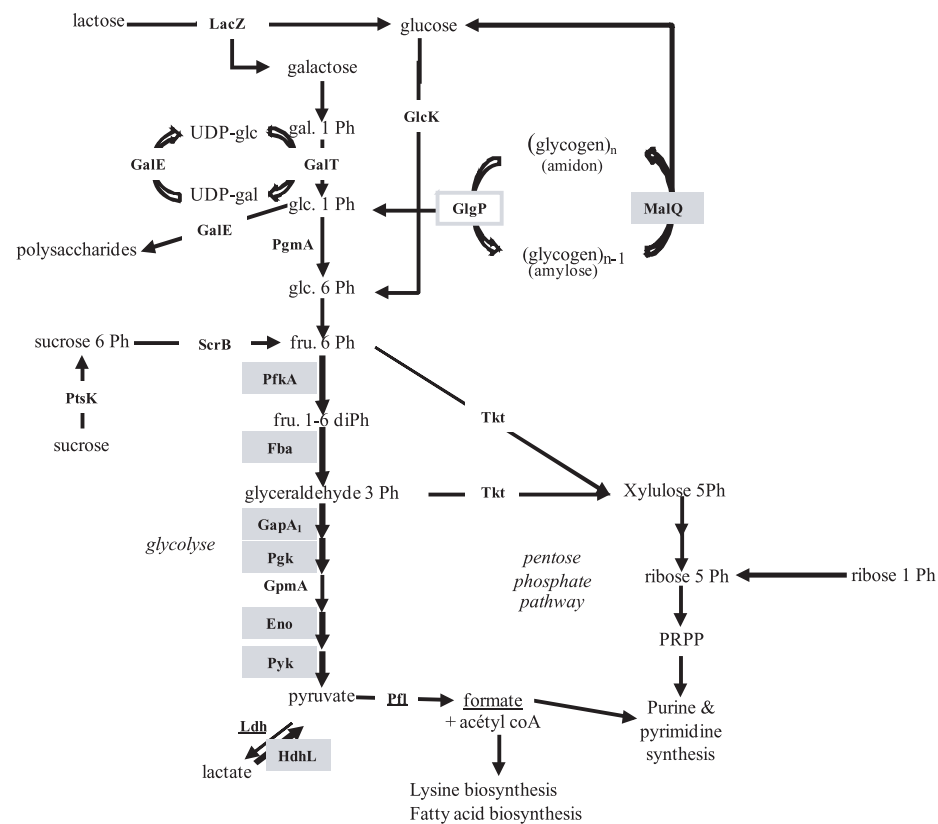


Figure 4. Model of carbohydrate metabolism of *S. thermophilus* in the digestive tract. Carbohydrate metabolism in *S. thermophilus* LMD-9 after its passage through the GIT, A) in presence (Ino-LMD9^{+lac}) or B) in absence of lactose (Ino-LMD9). Up-regulated enzymes in GIT compared to milk are grey shaded. We constructed this model from the present proteomic data and from predictions of metabolism pathways of LMD-9 strain genome. doi:10.1371/journal.pone.0028789.g004

maltose, and glycogen. Each metabolic pathway feeds glycolysis, suggesting that *S. thermophilus* metabolism converges to ATP production in the GIT. This also indicates that most of the sugar routes predicted by genome analysis, and so far not yet studied, are probably functional in *S. thermophilus* LMD-9. $\Delta lacS$ strain needed about 15 days to stably and maximally implant and thus possibly to set up a metabolic response by using alternative sugars and/or

by favoring the entrance of lactose by other unknown transporters. By studying the physiology of *S. thermophilus* in the digestive tract, we also propose that the protein MalQ may be involved in glycogen synthesis rather than in maltose metabolism. In absence of lactose, MalQ was induced in gut and we hypothesized that *S. thermophilus* stocked glycogen in order to face limiting environmental conditions [37]. In presence of lactose, both MalQ and

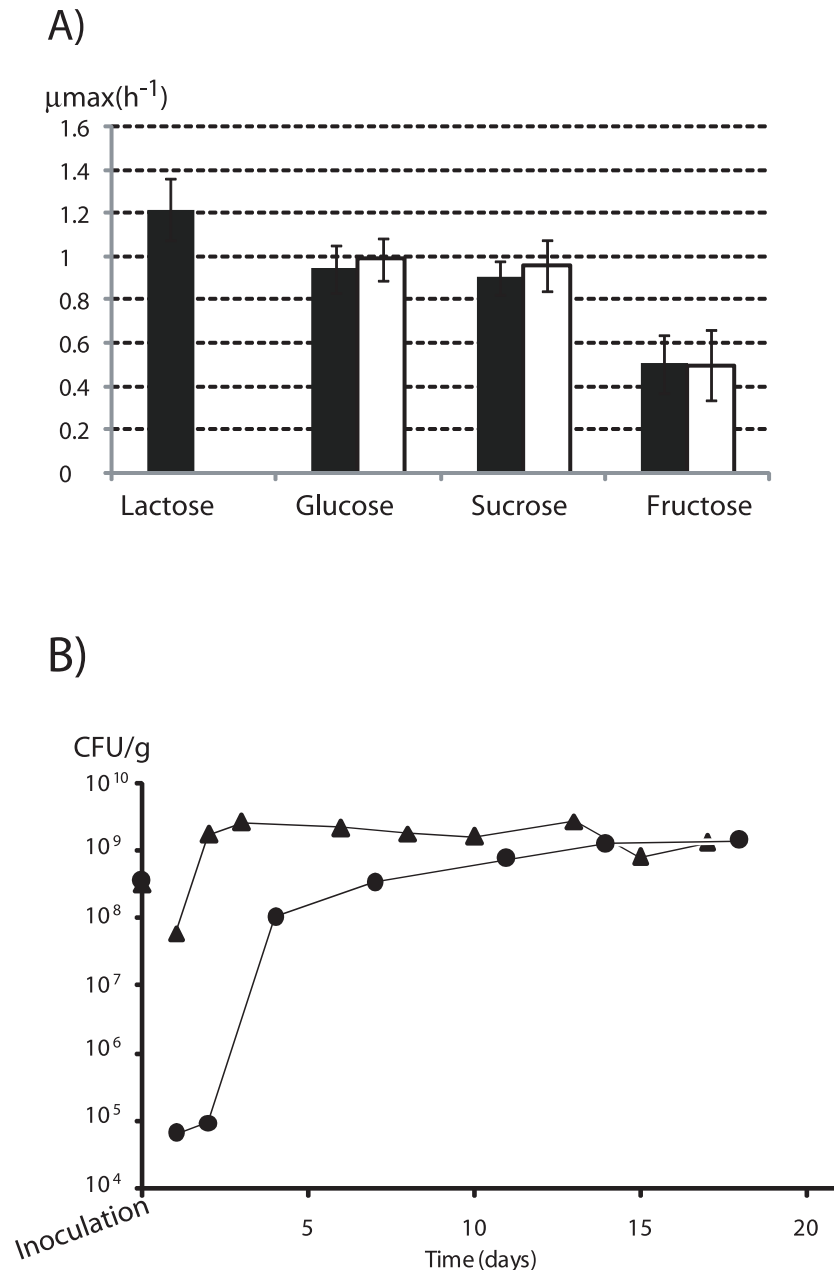


Figure 5. *S. thermophilus* $\Delta lacS$ characterization. A) *in vitro*: growth of the wild-type (■) and the $\Delta lacS$ (□) strains in M17 in presence of different sugars. B) *in vivo*: enumeration of viable wild-type (▲) and $\Delta lacS$ (●) strains isolated from faeces of Ino-LMD9^{+lac} (n=5) and Ino- $\Delta lacS$ ^{+lac} (n=5), respectively. doi:10.1371/journal.pone.0028789.g005

GlgP [responsible for glycogen breakdown in bacteria [38]] were induced, suggesting that equilibrium between anabolism and catabolism occurs in *S. thermophilus*. A similar simultaneous glycogen synthesis and degradation have been described in *Corynebacterium glutamicum* where glycogen is constantly recycled [39]. All our observations show that MalQ is not involved in maltose metabolism, in concordance with the fact that no MalE transporter is present in the genome of LMD-9 and that genes *malQ* and *glgP* (encoding potentially for a glycogen phosphorylase) are an operon in LMD-9. Glycogen could be of prime importance in the colonization, adaptation and survival of *S. thermophilus* within the GIT, as previously observed for other microorganisms, when present in starvation conditions [37] or during transition between nutrient-rich- and nutrient-poor environments [40].

Our present work sheds new light on the established association of *S. thermophilus* and lactose by revealing that lactose enhanced *S. thermophilus* kinetics, level of colonization and fermentative activity in the GIT. Our work suggests that a food product containing both a live *S. thermophilus* and lactose would favor the colonization and fermentative activity of *S. thermophilus* *in vivo*. In this context, our results follow the rationale of previous clinical observations and the nutritional assertion that the consumption of yogurt (containing lactose) could alleviate the symptoms of lactose intolerance.

Materials and Methods

Bacterial strains, media, and inoculating samples

The strains *S. thermophilus* LMD-9 (ATCC BAA-491, USA), and LMG18311 (BCCM collection, Belgium) were used. Stock cultures of *S. thermophilus* LMD-9 and LMG18311 were prepared in reconstituted 10% (wt/vol) Nilac skim milk (NIZO, Ede, the Netherlands) as previously described [41]. *S. thermophilus* monocultures were obtained by inoculating Nilac milk with 10^6 CFU/ml of stock cultures and incubated at 42°C until pH 5.4–5.5. One ml of culture was used for rat gavage and the remaining aliquots were frozen in liquid nitrogen and stored at –20°C until protein extraction. The cultures were enumerated *a posteriori* by plating appropriate dilutions on M17 agar lactose (10 g/L) for *S. thermophilus*. After 16 h (*S. thermophilus*) incubation at 42°C under anaerobiosis (Anaerocult A, Merck, Darmstadt, Germany), colonies were counted.

$\mu_{\max}$ determination

Cultures ($n = 3$) of *S. thermophilus* strains were performed in M17 supplemented with 10 g/L lactose, glucose, sucrose or fructose; the apparent growth rate ($\mu_{\max}$) was defined as the maximum slope of semi-logarithmic representation of growth curves assessed by O.D._{650 nm} measurements.

Insertional inactivation of *S. thermophilus* LMD-9 *lacS* gene

The kanamycin cassette of the plasmid pKa 2000 was PCR-amplified using the Phusion high fidelity DNA polymerase with AphA3-F (5'-CCAGCGAACCATTGTA^{3'}) and AphA3-R (5'-GTTGCGGATGTACTTCAG^{3'}) primers. The 1489 bp DNA fragments flanking the *lacS* gene were PCR-amplified using the Phusion DNA polymerase, the LMD-9 DNA as a template, and primers LacS-up (5'-TATGTGCCTGCCAGTCCA^{3'})/Kana-up-R (5'-AGGGGTCCCGAGCGCCTACGAGGAATTTGTATC-GATGACCTTTAGATTTTTCAT^{3'}) for the upstream fragment and primers LacS-down (5'-AACTGGAACGACTTCA-AC^{3'})/Kana-down (5'-CTTACCTATCACCTCAAATGGTTTC-GCTGGGTTTATCGTAACCTAATTTCAGAAAAA^{3'}) for the

downstream fragment. The 3' end of the upstream generated fragment contained a sequence complementary to the 5' end of the *kana* cassette whereas the 5' end of the downstream generated fragment contained a sequence complementary to the 3' end of the cassette. This allowed joining of these three fragments subsequent to Taq Phusion PCR using primers LacS-up and LacS-down. After purification with a QIAquick PCR purification kit, 500 ng of the resulting 3.4 kb fragment was further used to transform LMD-9 natural competent cells as described by Gardan *et al.* [42]. Transformants were selected on M17Glu plates with kanamycin and were then checked by PCR using oligonucleotides LacS-up and KanaR. Finally sequencing of the flanking regions was performed to ensure that no unwanted mutations were introduced.

Animals and experimental design

All procedures were carried out in accordance with European and French guidelines for the care and use of laboratory animals. Permission 78–123 is a permit number dedicated to M. Thomas. MICALIS (Microbiologie de l'Alimentation au Service de la Santé) review board specifically approved this study. At the age of 2 months, germ-free (GF) rats (male, Fisher 344) were inoculated either with *S. thermophilus* LMD-9 (Ino-LMD9^{+lac}, $n = 11$) or *S. thermophilus* LMG18311 (Ino-LMG18311^{+lac}, $n = 8$). 1 ml of a culture of *S. thermophilus* in Nilac milk (5×10^8 CFU/ml) was transferred to GF rats by oral gavage. As a control, GF^{+lac} rats were also inoculated with 1 ml of sterile Nilac milk (without bacteria). Following gavage, rats received water enriched with lactose (4.5%wt/vol). GF and mono-associated rats were housed in sterile Plexiglas isolators (Ingénia, Vitry-sur-Seine, France). All groups of rats received the same standard diet (UAR), which was sterilized by gamma irradiation. Twice a week *S. thermophilus* was enumerated by plating serial dilutions of the faeces on M17 lactose agar. All rats were euthanized at three months old, 30 days after gavage.

S. thermophilus $\Delta lacS$ strain was inoculated in GF rats to obtain Ino- $\Delta lacS^{+lac}$ rats. The $\Delta lacS$ inoculum was grown in M17+glucose and bacteria were enumerated by plating serial dilutions of the faeces on M17 glucose agar supplemented with kanamycin (1 mg/ml). Ino- $\Delta lacS^{+lac}$ ($n = 5$) rats drank 4.5% lactose-enriched water. The presence of kanamycin cassette disrupting the *lacS* gene was checked by PCR in faeces of Ino- $\Delta lacS^{+lac}$. Ino- $\Delta lacS^{+lac}$ rats were euthanized 18 days after gavage.

Rats were anesthetized with isoflurane and tissues were recovered. The colon was immediately used, for colonic epithelial cell isolation or for histological procedures as it has been described in Cherbuy *et al.* [43,44].

Western blot analysis

Colonic proteins from isolated epithelial cells were used for Western blot analysis as previously described [24] by using a denaturing (SDS)-polyacrylamide gel. Proteins were analysed using anti-p27^{kip1} (Santa Cruz Biotechnology; 1/500). GAPDH was used as loading control. Signals imprinted on autoradiography films were quantified by scanning densitometry of the autoradiograph using Biovision 1000 and logiciel bio1D (Vilber Lourmat, France).

Dosage of D- and L-lactates

D- and L-lactates were measured in caecal contents and faeces with the Biosentec D/L lactic acid enzymatic kits according to the manufacturer instructions (Biosentec, Toulouse, France) as also described in Rul *et al.* [12].

Histology analysis

Colon samples were cut into 2 cm sections, fixed in 4% paraformaldehyde (4 hours, room temperature), dehydrated and embedded in paraffin according to standard histological protocols. Four micrometer sections were mounted on SuperFrost® Plus slides. Slides were stained with Hematoxylin-Eosin-Safran (HES) for histological analysis. Crypt depths were determined with NDP.view software (Hamamatsu). Only U shaped longitudinally cut crypts with open lumina along the crypt axis were analysed. Results were the mean obtained by analysis at least 20 crypts per rat (Ino-LMD9^{lac}, n = 5; Ino-LMG18311^{lac}, n = 3).

RNA isolation and quantitative RT-PCR analysis

Total RNAs were extracted from colon epithelial cells of GF^{lac} (n = 3), and Ino-LMD9^{lac} (n = 5) by the guanidinium thiocyanate method. The *slc16a1* and *slc5a8* mRNA quantification was performed as we have previously described [12].

Bacterial protein extraction, comparative bi-dimensional (2-DE) protein analysis and image analysis

Cytoplasmic proteins were extracted from bacteria as previously described [12] either from milk cultures (n = 3) or faecal samples (5 g of frozen faeces from 3 Ino-LMD9^{lac} rats). A volume of cytosolic fraction corresponding to 250 µg of proteins was treated as previously described [45]. Bi-dimensional (2-DE) protein analysis and image analysis were performed according to Rul *et al.* [12]. MS analyses were performed using a Voyager-DE-STR (Applied Biosystems, Framingham, USA) on the PAPPSO proteomic platform (<http://pappso.inra.fr>). The proteins were identified using MS-FIT (<http://prospector.ucsf.edu>).

References

- Bolotin A, Quinquis B, Renault P, Sorokin A, Ehrlich SD, et al. (2004) Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Nat Biotechnol* 22: 1554–1558.
- Delorme C (2008) Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus*. *Int J Food Microbiol* 126: 274–277.
- Guarner F, Perdigon G, Corthier G, Salminen S, Koletzko B, et al. (2005) Should yoghurt cultures be considered probiotic? *Br J Nutr* 93: 783–786.
- Pagnini C, Saeed R, Bamias G, Arseneau KO, Pizarro TT, et al. (2010) Probiotics promote gut health through stimulation of epithelial innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 454–459.
- Saavedra JM, Abi-Hanna A, Moore N, Yolken RH (2004) Long-term consumption of infant formulas containing live probiotic bacteria: tolerance and safety. *Am J Clin Nutr* 79: 261–267.
- Veiga P, Gallini CA, Beal C, Michaud M, Delaney ML, et al. (2010) Bifidobacterium animalis subsp. lactis fermented milk product reduces inflammation by altering a niche for colitogenic microbes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 18132–18137.
- Campbell AK, Waud JP, Matthews SB (2005) The molecular basis of lactose intolerance. *Sci Prog* 88: 157–202.
- Lomer MC, Parkes GC, Sanderson JD (2008) Review article: lactose intolerance in clinical practice—myths and realities. *Aliment Pharmacol Ther* 27: 93–103.
- Drouault S, Anba J, Corthier G (2002) *Streptococcus thermophilus* is able to produce a beta-galactosidase active during its transit in the digestive tract of germ-free mice. *Appl Environ Microbiol* 68: 938–941.
- He T, Priebe MG, Zhong Y, Huang C, Harmsen HJ, et al. (2008) Effects of yogurt and bifidobacteria supplementation on the colonic microbiota in lactose-intolerant subjects. *J Appl Microbiol* 104: 595–604.
- Pochart P, Dewit O, Desjeux JF, Bourlioux P (1989) Viable starter culture, beta-galactosidase activity, and lactose in duodenum after yogurt ingestion in lactase-deficient humans. *Am J Clin Nutr* 49: 828–831.
- Rul F, Ben-Yahia L, Chegdani F, Wrzosek L, Thomas S, et al. (2011) Impact of the Metabolic Activity of *Streptococcus thermophilus* on the Colon Epithelium of Gnotobiotic Rats. *J Biol Chem* 286: 10288–10296.
- Adolfsson O, Meydani SN, Russell RM (2004) Yogurt and gut function. *Am J Clin Nutr* 80: 245–256.
- Hertzler SR, Huynh BC, Savaiano DA (1996) How much lactose is low lactose? *J Am Diet Assoc* 96: 243–246.
- Hertzler SR, Savaiano DA (1996) Colonic adaptation to daily lactose feeding in lactose maldigesters reduces lactose intolerance. *Am J Clin Nutr* 64: 232–236.
- Szilagyi A (2002) Review article: lactose—a potential prebiotic. *Aliment Pharmacol Ther* 16: 1591–1602.
- Mater DD, Drouault-Holowacz S, Oozzer R, Langella P, Anba J, et al. (2006) Beta-galactosidase production by *Streptococcus thermophilus* is higher in the small intestine than in the caecum of human-microbiota-associated mice after lactose supplementation. *Br J Nutr* 96: 177–181.
- Turpin W, Humblot C, Thomas M, Guyot JP (2010) Lactobacilli as multifaceted probiotics with poorly disclosed molecular mechanisms. *Int J Food Microbiol* 143: 87–102.
- Van den Bogaard PTC, Kleerebezem M, Kuipers OP, De Vos WM (2000) Control of lactose transport, beta-galactosidase activity, and glycolysis by CcpA in *Streptococcus thermophilus*: Evidence for carbon catabolite repression by a non-phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system sugar. *Journal of Bacteriology* 182: 5982–5989.
- Hols P, Hancy F, Fontaine L, Grossiord B, Prozzi D, et al. (2005) New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiol Rev* 29: 435–463.
- Bolotin A, Quinquis B, Renault P, Sorokin A, Ehrlich SD, et al. (2004) Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Nat Biotechnol* 22: 1554–1558.
- Makarova K, Slesarev A, Wolf Y, Sorokin A, Mirquin B, et al. (2006) Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *PNAS* 103: 15611–15616.
- Foucaud C, Poolman B (1992) Lactose transport system of *Streptococcus thermophilus*. Functional reconstitution of the protein and characterization of the kinetic mechanism of transport. *J Biol Chem* 267: 22087–22094.
- Cherbuy C, Honvo-Houeto E, Bruneau A, Bridonneau C, Mayeur C, et al. (2010) Microbiota matures colonic epithelium through a coordinated induction of cell cycle-related proteins in gnotobiotic rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299: G348–357.
- Fukuda S, Toh H, Hase K, Oshima K, Nakanishi Y, et al. (2011) Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* 469: 543–547.
- Chang DE, Smalley DJ, Tucker DL, Leatham MP, Norris WE, et al. (2004) Carbon nutrition of *Escherichia coli* in the mouse intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 7427–7432.
- Denou E, Pridmore RD, Berger B, Panoff JM, Arigoni F, et al. (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.

Statistical analysis

Results are presented as means ± SE for the number of animals indicated. Comparisons of group data between different batches of rats were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's student range test where appropriate. Significance was for *P* value lower than 0.05. Statistical analysis was performed using the JMP® software (version 7, SAS institute INC).

Supporting Information

Figure S1 Fold changes in protein abundance (2-DE) of *S. thermophilus* LMD-9 between faeces in presence of lactose and late growth phase in milk. (DOCX)

Acknowledgments

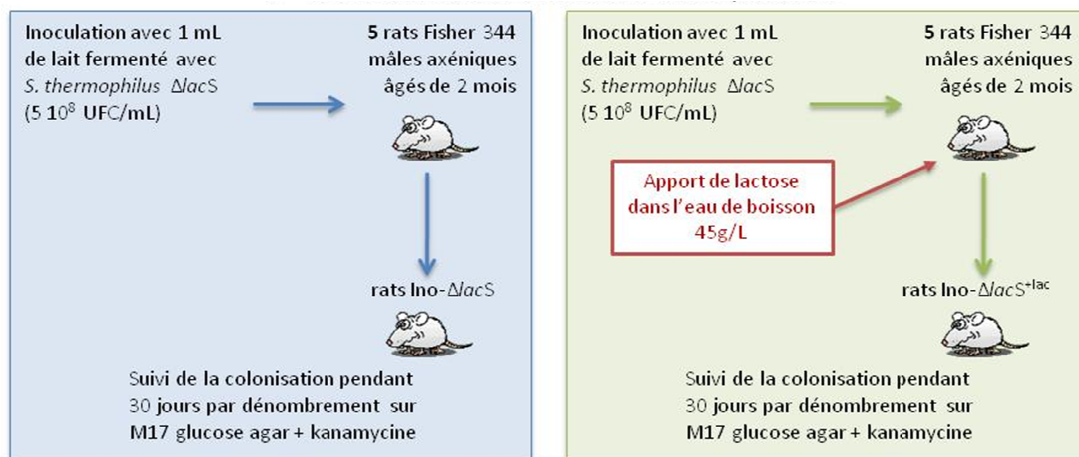
We thank Sylvie Miquel and Neil Dufton for fruitful discussions and critical reading of the manuscript. The authors would like to thank the team of animal facilities (ANAXEM team, Micalis) and Stephan Bouet for technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MT CC FR. Performed the experiments: MT LW LBY MLN CG DC CM. Analyzed the data: MT LW LBY CM FR. Contributed reagents/materials/analysis tools: MT LW LBY MLN CG DC CM CC FR. Wrote the paper: MT PL CC FR.

28. Marco ML, de Vries MC, Wels M, Molenaar D, Mangell P, et al. (2010) Convergence in probiotic *Lactobacillus* gut-adaptive responses in humans and mice. *ISME J* 4: 1481–1484.
29. Marco ML, Peters TH, Bongers RS, Molenaar D, van Hemert S, et al. (2009) Lifestyle of *Lactobacillus plantarum* in the mouse caecum. *Environ Microbiol* 11: 2747–2757.
30. Roy K, Meyrand M, Corthier G, Monnet V, Mistou MY (2008) Proteomic investigation of the adaptation of *Lactococcus lactis* to the mouse digestive tract. *Proteomics* 8: 1661–1676.
31. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, et al. (2010) A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464: 59–65.
32. Joly F, Mayeur C, Messing B, Lavergne-Slove A, Cazals-Hatem D, et al. (2009) Morphological adaptation with preserved proliferation/transporter content in the colon of patients with short bowel syndrome. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 297: G116–123.
33. Duncan SH, Belenguer A, Holtrop G, Johnstone AM, Flint HJ, et al. (2007) Reduced dietary intake of carbohydrates by obese subjects results in decreased concentrations of butyrate and butyrate-producing bacteria in feces. *Appl Environ Microbiol* 73: 1073–1078.
34. Hove H, Mortensen PB (1995) Colonic lactate metabolism and D-lactic acidosis. *Dig Dis Sci* 40: 320–330.
35. Hove H, Rye Clausen M, Brobech Mortensen P (1993) Lactate and pH in faeces from patients with colonic adenomas or cancer. *Gut* 34: 625–629.
36. Munoz-Tamayo R, Laroche B, Walter E, Dore J, Duncan SH, et al. (2011) Kinetic modelling of lactate utilization and butyrate production by key human colonic bacterial species. *FEMS Microbiol Ecol* 76: 615–624.
37. Wilson WA, Roach PJ, Montero M, Baroja-Fernandez E, Munoz FJ, et al. (2010) Regulation of glycogen metabolism in yeast and bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 34: 952–985.
38. Alonso-Casajus N, Dauvillee D, Viale AM, Munoz FJ, Baroja-Fernandez E, et al. (2006) Glycogen phosphorylase, the product of the *glgP* Gene, catalyzes glycogen breakdown by removing glucose units from the nonreducing ends in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 188: 5266–5272.
39. Seibold GM, Eikmanns BJ (2007) The *glgX* gene product of *Corynebacterium glutamicum* is required for glycogen degradation and for fast adaptation to hyperosmotic stress. *Microbiology* 153: 2212–2220.
40. Bourassa L, Camilli A (2009) Glycogen contributes to the environmental persistence and transmission of *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* 72: 124–138.
41. Herve-Jimenez L, Guillaud I, Guedon E, Gautier C, Boudebouze S, et al. (2008) Physiology of *Streptococcus thermophilus* during the late stage of milk fermentation with special regard to sulfur amino-acid metabolism. *Proteomics* 8: 4273–4286.
42. Gardan R, Besset C, Guillot A, Gitton C, Monnet V (2009) The oligopeptide transport system is essential for the development of natural competence in *Streptococcus thermophilus* strain LMD-9. *J Bacteriol* 191: 4647–4655.
43. Cherbuy C, Andrieux C, Honvo-Houeto E, Thomas M, Ide C, et al. (2004) Expression of mitochondrial HMGCoA synthase and glutaminase in the colonic mucosa is modulated by bacterial species. *Eur J Biochem* 271: 87–95.
44. Cherbuy C, Darcy-Vrillon B, Morel MT, Pegorier JP, Duce PH (1995) Effect of germfree state on the capacities of isolated rat colonocytes to metabolize n-butyrate, glucose, and glutamine. *Gastroenterology* 109: 1890–1899.
45. Derzelle S, Bolotin A, Mistou MY, Rul F (2005) Proteome analysis of *Streptococcus thermophilus* grown in milk reveals pyruvate formate-lyase as the major upregulated protein. *Appl Environ Microbiol* 71: 8597–8605.

1^{ère} colonisation: lait fermenté avec *S. thermophilus* $\Delta lacS$



2^{ème} colonisation: dilution de fèces (*S. thermophilus* $\Delta lacS$ après passage dans le TD)

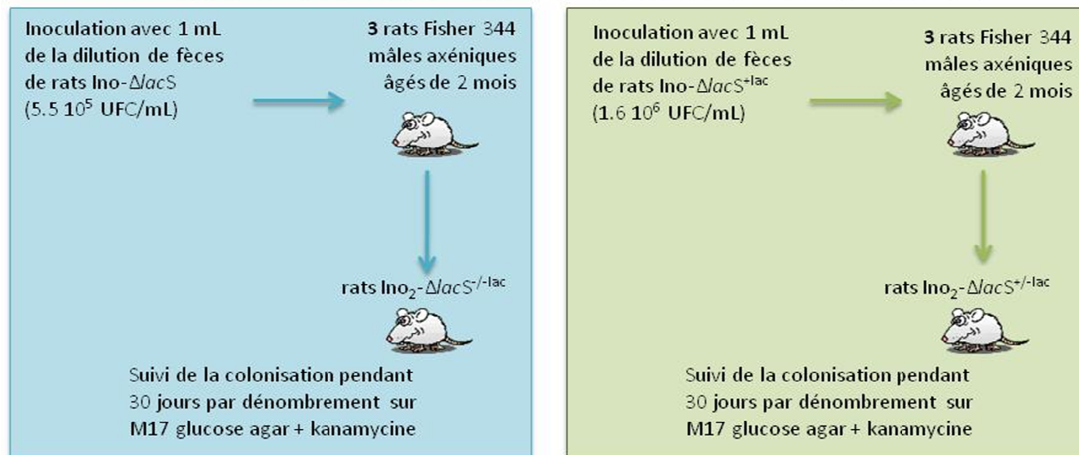


Figure 19: Construction de modèles en cascade de gnotobiotie avec *S. thermophilus* $\Delta lacS$

3 Résultats complémentaires

Comparaison de la cinétique de colonisation du TD par le mutant *S. thermophilus* $\Delta lacS$ avec et sans apport de lactose

Afin de mieux étudier le rôle de la perméase LacS et l'impact de l'apport du lactose sur la colonisation au TD, nous avons suivi la cinétique de colonisation du mutant *S. thermophilus* $\Delta lacS$ et nous l'avons comparé à celle de la souche sauvage dans le tractus de rats gnotobiotiques (avec et sans apport de lactose 45 g/L).

3.1 Matériels et méthodes :

3.1.1 Suivi de la cinétique de colonisation du TD par *S. thermophilus* $\Delta lacS$:

Quatre modèles de rats gnotobiotiques ont été construits selon les protocoles suivants (Figure 19) :

- 1^{ère} colonisation : du lait Nilac (additionné de 10g/L de glucose) fermenté avec *S. thermophilus* $\Delta lacS$ a été utilisé pour inoculer deux groupes de 5 rats axéniques âgés de 2 mois. Du lactose à 45 g/L a été rajouté dans l'eau de boisson de l'un des deux groupes de rats. Le suivi de la colonisation du TD des deux groupes de rats a été réalisé sur 4 semaines par dénombrement sur M17 glucose agar + kanamycine (1mg/mL).
- 2^{ème} colonisation : après 4 semaines de colonisation, des fèces de rats de chacun des groupes précédents sont dilués dans du M17 et inoculés respectivement à deux groupes constitué de 3 rats axéniques âgés de 2 mois chacun. Le suivi de la colonisation du TD des différents rats a été réalisé sur 4 semaines par dénombrement sur M17 glucose agar + kanamycine (1mg/mL).

3.1.2 Dosage de lactate

Le lactate produit chez rats mono-associés avec *S. thermophilus* $\Delta lacS$ dans le contenu caecal et les fèces a été dosé selon le protocole décrit précédemment (Chapitre 1, (Rul *et al.*, 2011)).

3.1.3 Mesure du pH

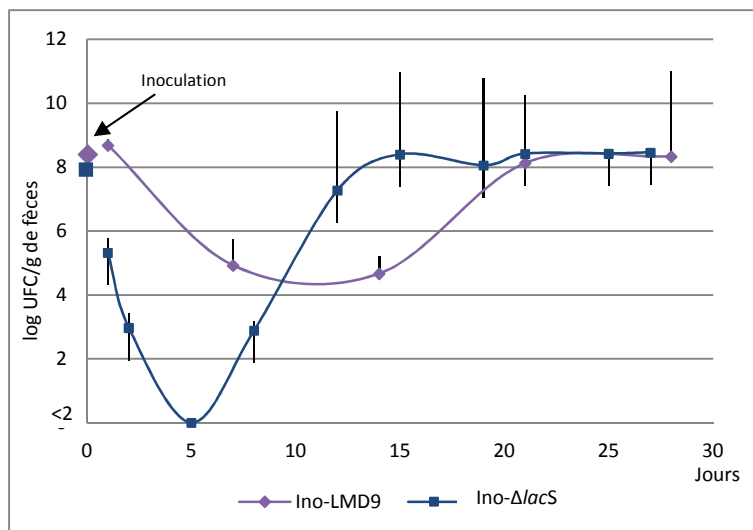


Figure 20: Cinétiques de colonisation du TD de rats axéniques par *S. thermophilus* et *S. thermophilus* $\Delta lacS$ sans apport de lactose.

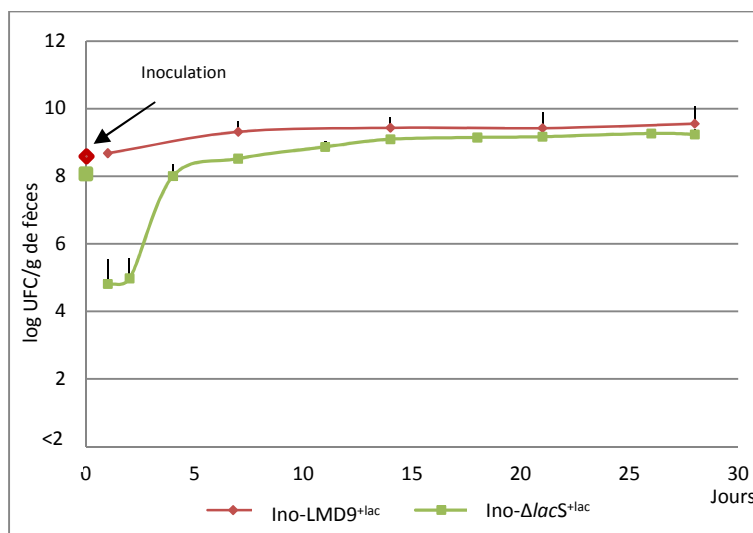


Figure 21 Cinétiques de colonisation du TD de rats axéniques par *S. thermophilus* et *S. thermophilus* $\Delta lacS$ avec apport de lactose (45g/L).

Le pH de lait Nilac (pH initial 6.12) a été mesuré après fermentation avec *S. thermophilus* et *S. thermophilus* $\Delta lacS$ afin d'évaluer la croissance bactérienne.

3.2 Résultats et discussion

Quel est l'impact de l'invalidation de la perméase de *S. thermophilus* $\Delta lacS$ sur la colonisation du TD des rats gnotobiotiques ? Le lactose joue-t-il un rôle malgré l'invalidation de la perméase LacS ?

En absence de lactose et quand la perméase LacS est invalidée, la colonisation du TD par *S. thermophilus* $\Delta lacS$ chute les 5 premiers jours et n'est plus détectable ($< 10^2$ UFC/g de fèces). Elle augmente ensuite progressivement et se stabilise au bout de 15 jours à $2.9 \pm 1.45 \cdot 10^8$ UFC/g de fèces (Figure 20). En revanche, la colonisation du TD par la souche sauvage *S. thermophilus* nécessite un délai d'adaptation plus long, de 21 jours, elle chute moins les premiers jours d'adaptation en comparaison avec le mutant $\Delta lacS$.

Néanmoins, les souches sauvage et mutante atteignent le même niveau d'implantation à partir de la troisième semaine à savoir $\approx 3 \cdot 10^8$ UFC/g de fèces et s'y maintiennent jusqu'à la quatrième semaine. Ainsi, la perméase à lactose joue un rôle pendant les premiers jours de la colonisation du TD sur le niveau de colonisation et sur la durée nécessaire à l'adaptation. La perméase à lactose (en absence de lactose) serait impliquée dans l'adaptation et les capacités d'implantation de *S. thermophilus*.

Lorsqu'il y a un apport de lactose, la comparaison de la colonisation du TD par *S. thermophilus* et *S. thermophilus* $\Delta lacS$ montre que la souche sauvage colonise le TD et se stabilise plus rapidement que le mutant (Article 2). En effet, l'apport de lactose permet de raccourcir la période d'adaptation de *S. thermophilus* $\Delta lacS$ au TD de près de 15 à 5 jours et d'augmenter 10 fois le niveau de colonisation par *S. thermophilus* $\Delta lacS$ à savoir $1.7 \pm 0.7 \cdot 10^9$ UFC/g de fèces (Figure 21). Comme nous l'avons déjà démontré, en présence de lactose *S. thermophilus* s'adapte plus rapidement et colonise le TD à $3 \cdot 10^9$ UFC/g de fèces. Ainsi, le lactose confère un avantage pour la colonisation et une accélération probable de l'adaptation au TD à *S. thermophilus* et au mutant $\Delta lacS$ de façon indépendante de la perméase à lactose.

En comparant la cinétique de colonisation de *S. thermophilus* $\Delta lacS$ avec et sans apport de lactose, nous observons l'effet du lactose sur l'augmentation du niveau de

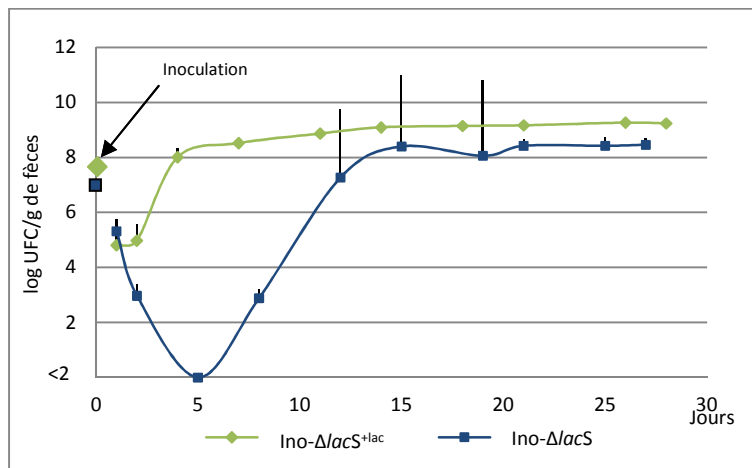


Figure 22: Cinétiques de colonisation du TD de rats axéniques par *S. thermophilus* $\Delta lacS$ avec et sans apport de lactose.

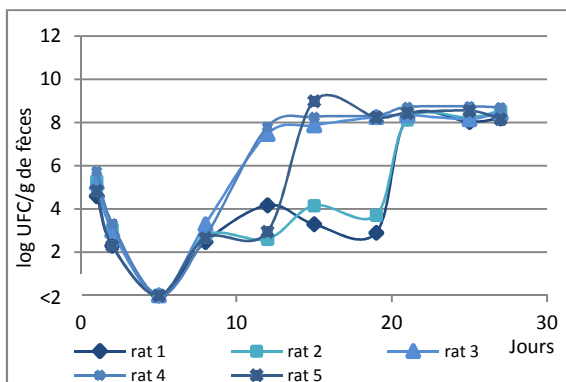


Figure 23: Cinétiques de colonisation du TD par *S. thermophilus* $\Delta lacS$, rat par rat, sans apport de lactose.

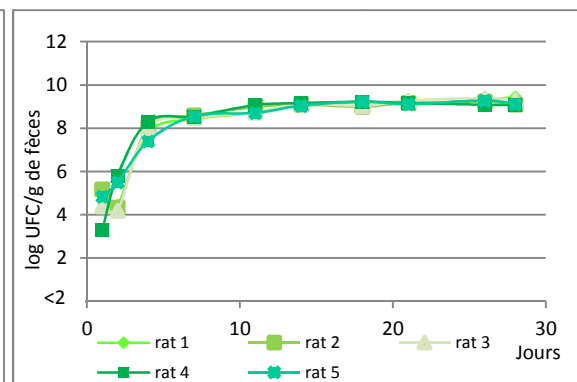


Figure 24: Cinétiques de colonisation du TD par *S. thermophilus* $\Delta lacS^{+lac}$, rat par rat, avec apport de lactose à 4.5%.

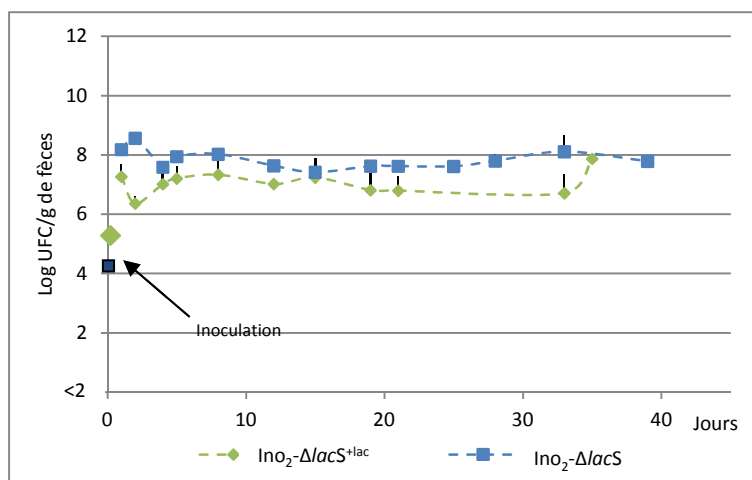


Figure 25: Cinétiques de recolonisation du TD de rats axéniques par *S. thermophilus* $\Delta lacS$ après passage dans le TD.

colonisation indiquant donc probablement une accélération de l'adaptation pendant les premiers jours (Figure 22).

L'étude de la cinétique de colonisation du TD rat par rat par *S. thermophilus* $\Delta lacS$ sans apport de lactose montre une chute du niveau de colonisation commun à tous les rats pendant les 7 premiers jours puis une adaptation progressive et variable selon les rats (Figure 23). Cependant, à partir du 21^{ème} jour *S. thermophilus* $\Delta lacS$ atteint le même niveau de colonisation chez les 5 rats. L'apport de lactose permet d'augmenter le niveau de colonisation et d'obtenir une adaptation et une stabilité qui est homogène chez tous les rats (Figure 24).

Ainsi, malgré l'invalidation de la perméase à lactose LacS, l'apport de lactose augmente le niveau de colonisation de façon reproductible et homogène chez les différents rats.

Est-ce que l'adaptabilité au TD acquise est stable chez *S. thermophilus* $\Delta lacS$?

S. thermophilus $\Delta lacS$ semble avoir acquis une adaptabilité au TD après 4 semaines de colonisation et ce, avec ou sans apport de lactose. La question qui s'est posée est : est-ce que cette adaptabilité est stable? Pour vérifier cela, j'ai inoculé des rats axéniques avec une dilution de *S. thermophilus* $\Delta lacS$ contenu dans les fèces des rats ayant reçu ou pas du lactose obtenus précédemment (Figure 25).

- *S. thermophilus* $\Delta lacS$ issu des fèces de rats n'ayant pas reçu de lactose (Ino- $\Delta lacS$) colonise le TD des rats (Ino₂- $\Delta lacS$) sans présenter de phase d'adaptation. La colonisation est homogène entre les différents rats et se stabilise à 10⁸ UFC/g de fèces dès le premier jour (Figure 26). Ainsi, l'adaptabilité au TD semble être conservée après une ré-inoculation et *S. thermophilus* $\Delta lacS$ maintient le même niveau de colonisation de 10⁸ UFC/g de fèces qu'enfin d'expérience chez les rats Ino- $\Delta lacS$.

- *S. thermophilus* $\Delta lacS$ issu des fèces de rats ayant reçu du lactose (Ino- $\Delta lacS^{+lac}$) colonise le TD des rats (Ino₂- $\Delta lacS^{+lac}$) en présentant une légère phase d'adaptation indiquée par une baisse de la colonisation d'un niveau de 1 log le premier jour puis se stabilise (Figure 27). L'allure de la cinétique de colonisation du TD propre à chacun des trois rats Ino₂- $\Delta lacS^{+lac}$ montre une légère hétérogénéité par rapport à celle des rats Ino₂- $\Delta lacS$. En rappelant que *S. thermophilus* $\Delta lacS$ s'est adapté et a colonisé le TD en présence de lactose lors de la

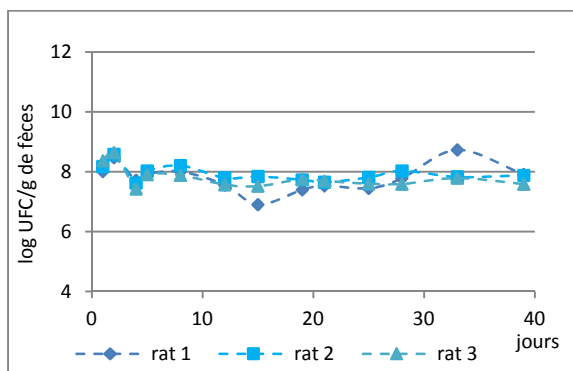


Figure 26: Cinétiques de recolonisation du TD de rats axéniques par *S. thermophilus* $\Delta lacS$ rat par rat après passage dans le TD.

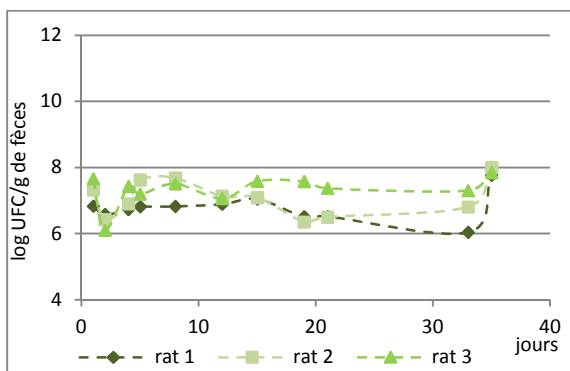


Figure 27: Cinétiques de recolonisation du TD de rats axéniques par *S. thermophilus* $\Delta lacS$ rat par rat après passage dans le TD et avoir reçu du lactose.

Tableau 15: Caractéristiques des deux colonisations du TD

1 ^{ère} colonisation	5 rats <i>Ino-ΔlacS</i>	5 rats <i>Ino-ΔlacS</i> ^{+lac}
Apport de lactose	Non	Oui à 45 g/L
Phase d'adaptation	Longue (21 jours)	Courte (5 jours)
Cinétique de colonisation	Lente et hétérogène	Rapide et homogène
Niveau final de colonisation	10 ⁸ UFC/g de fèces	1.7 10 ⁹ UFC/g de fèces
2 ^{ème} colonisation	3 rats <i>Ino₂-ΔlacS</i> ^{-/-lac}	3 rats <i>Ino₂-ΔlacS</i> ^{+/-lac}
Apport de lactose	Non	Non
Phase d'adaptation	Absente	Très courte (1 jour)
Cinétique de colonisation	Rapide et homogène	Rapide et légèrement hétérogène
Niveau final de colonisation	10 ⁸ UFC/g de fèces	10 ⁸ UFC/g de fèces

première inoculation, l'hétérogénéité peut être expliquée par une adaptation mise en place par *S. thermophilus* $\Delta lacS$ pour s'accommoder à l'absence de lactose. Néanmoins, *S. thermophilus* $\Delta lacS$ atteint le même niveau, 10^8 UFC/g de fèces, et cela ayant reçu du lactose ou non lors de la première colonisation.

Le tableau 15 synthétise les caractéristiques du mutant *S. thermophilus* $\Delta lacS$ lors de la première et de la deuxième colonisation du TD.

L'adaptation de *S. thermophilus* $\Delta lacS$ au TD s'est probablement faite par une adaptation génétique à l'hôte et/ou par la mise en place des voies physiologiques de régulation en réponse aux conditions du TD. *S. thermophilus* $\Delta lacS$ retrouve donc le même environnement lors de la deuxième colonisation que celui auquel il s'est adapté lors première colonisation à savoir le TD de rats axéniques âgés de 2 mois. Les éventuelles mutations acquises ou l'activation de certaines voies métaboliques par le mutant dans le TD semblent être conservées après re-inoculation.

Dans la littérature, une seule étude présente un cas de conservation de l'adaptation lors du deuxième passage dans le TD. Chiaramonte et ses collaborateurs montrent la conservation de l'adaptation au TD de souris axénique chez *Lactobacillus sakei* (*L. sakei*) (Chiaramonte *et al.*, 2010). Cette bactérie colonise rapidement le TD de souris axéniques et atteint 10^9 UFC/g de fèces. L'adaptation au TD s'est traduite par l'apparition de colonies de deux morphotypes différents le 7^{ème} jour et le 15^{ème} jour de colonisation. Ensuite, les deux colonies de morphotypes différents ont été remises en culture et inoculées à des souris axéniques. Lors du deuxième passage dans le TD, les colonies obtenues ont présenté les deux morphotypes.

Dans la suite de ce travail, je me suis intéressée à voir si cette adaptation acquise est reflétée par l'activité métabolique de *S. thermophilus* $\Delta lacS$ dans le TD lors de multiples colonisations.

Est-ce que *S. thermophilus* $\Delta lacS$ conserve son activité métabolique dans le TD?

Comme nous l'avons déjà observé, *S. thermophilus* $\Delta lacS$ produit exclusivement du L-lactate dans le TD des rats.

En premier lieu, j'ai suivi la production de L-lactate par *S. thermophilus* $\Delta lacS$ dans les fèces des rats Ino- $\Delta lacS$, des rats Ino- $\Delta lacS^{+lac}$, des rats Ino₂- $\Delta lacS^{-/-lac}$ et des rats Ino₂- $\Delta lacS^{+/-lac}$. J'ai remarqué que la production de L-lactate n'est détectable qu'à partir d'une

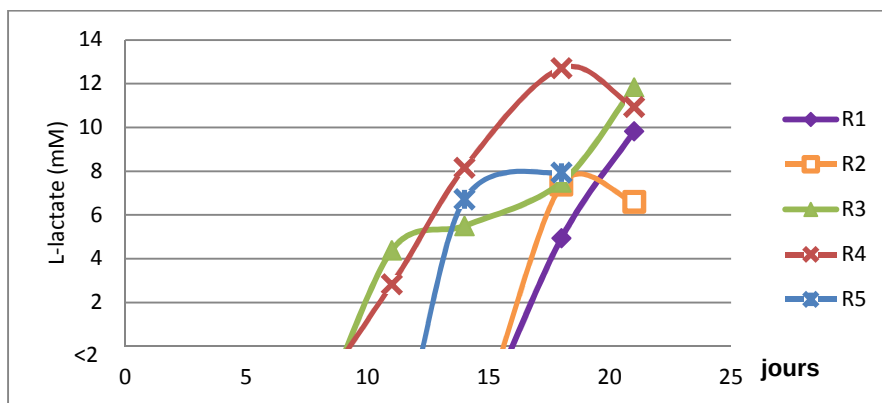


Figure 28: Suivi de la production de L-lactate au cours de la colonisation du TD par *S. thermophilus* $\Delta lacS$, rat par rat

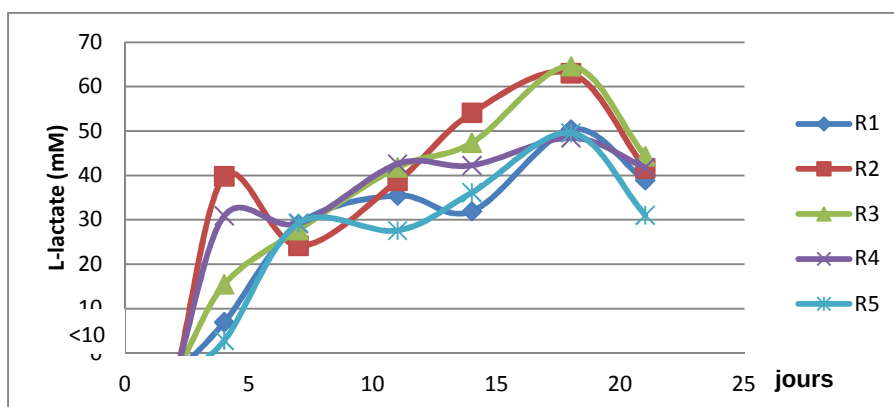


Figure 29: Suivi de la production de L-lactate au cours de la colonisation du TD par *S. thermophilus* $\Delta lacS^{+lac}$, rat par rat, avec apport de lactose à 4.5%.

Tableau 16 : Concentration de L-lactate produit dans le TD en mM

1 ^{ère} colonisation	Ino- $\Delta lacS$	Ino-LMD9	Ino- $\Delta lacS^{+lac}$	Ino-LMD9 ^{+lac}
Niveau de colonisation	10^8 UFC/g	10^8 UFC/g	$1.7 \cdot 10^9$ UFC/g	$3 \cdot 10^9$ UFC/g
L-lactate (mM)	7.03 ± 4.1	9.8 ± 2.5	41 ± 1	49.9 ± 5.7
2 ^{ème} colonisation	Ino ₂ - $\Delta lacS^{-/-lac}$		Ino ₂ - $\Delta lacS^{+/-lac}$	
Niveau de colonisation	10^8 UFC/g		10^8 UFC/g	
L-lactate (mM)	7.05 ± 1.16		8.38 ± 3.6	

Tableau 17 : pH du lait après fermentation avec *S. thermophilus* et *S. thermophilus* $\Delta lacS$

	<i>S. thermophilus</i>	<i>S. thermophilus</i> $\Delta lacS$
Avant passage dans le TD	4,39	6,06
Après passage dans le TD	4,5	4,45

colonisation du TD à hauteur de 10^6 UFC/g de fèces et ce pour les rats ayant reçu ou pas du lactose (Figures 28 et 29). Le tableau 16 présente les concentrations en L-lactate dans les fèces au 21^{ème} jour de colonisation.

Sans apport de lactose, la production de lactate est du même ordre de grandeur chez la souche sauvage et le mutant. De même, lorsqu'il y a un apport de lactose, la production de lactate est aussi du même ordre de grandeur chez la souche sauvage et le mutant.

Malgré l'invalidation de la perméase à lactose, la production de lactate augmente de plus de cinq fois chez les rats Ino- Δ lacS^{+lac} par rapport au rats Ino- Δ lacS. Ainsi, le lactose stimule la glycolyse chez *S. thermophilus* Δ lacS même en absence de la perméase LacS. Suite à l'augmentation de l'induction des protéines impliquées dans la glycolyse observée chez *S. thermophilus* dans le TD de rats gnotobiotiques, nous pouvons supposer que le lactose est éventuellement transporté dans la cellule par d'autres transporteurs que la perméase LacS. Une éventuelle activation de voies alternatives de transport du lactose pourrait être la résultante des conditions dans le TD et l'absence de la perméase LacS.

Dans une seconde partie, j'ai étudié l'influence de l'adaptation de *S. thermophilus* et de *S. thermophilus* Δ lacS au TD sur leur principale activité, à savoir la fermentation du lait. Pour cela, j'ai comparé l'acidification du lait par la souche sauvage et le mutant avant et après passage dans le TD. Le pH du lait après 5h 30min de fermentation est indiqué dans le tableau 17 sachant que le pH initial du lait est en moyenne de 6.12:

Ainsi, après passage dans le TD, *S. thermophilus* Δ lacS semble avoir acquis les capacités nécessaires à acidifier le lait et par conséquent probablement aussi des capacités à utiliser le lactose sucre majoritaire du lait. Nous pouvons donc supposer que le lactose est transporté par un autre transporteur que LacS.

Les animaux gnotobiotiques offrent ainsi un modèle simple mais adéquat à l'étude des mécanismes d'adaptation de la bactérie à l'hôte. Les bactéries peuvent s'adapter à la fois par la régulation des gènes et des mutations adaptatives. Une caractérisation génomique et protéomique des souches adaptées au TD nous permettrait d'obtenir des informations pour identifier les éventuelles mutations dues à l'adaptation au TD et les protéines induites pour compenser l'absence de la perméase à lactose.

Streptococcus thermophilus LMD-9



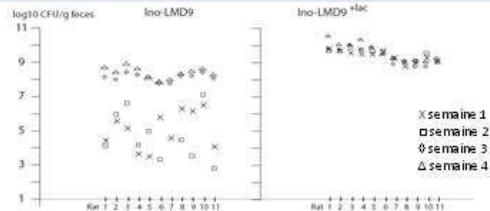
Inoculation de rats axéniques avec du lait fermenté avec *S. thermophilus* et apport de lactose dans l'eau de boisson (45g/L)

Rat (male, Fisher 344)

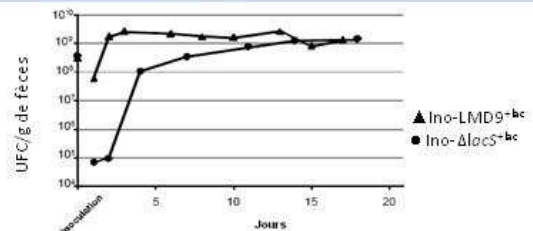


Rat Ino-LMD9^{lac}

1. L'apport de lactose permet une colonisation rapide et stable du TD

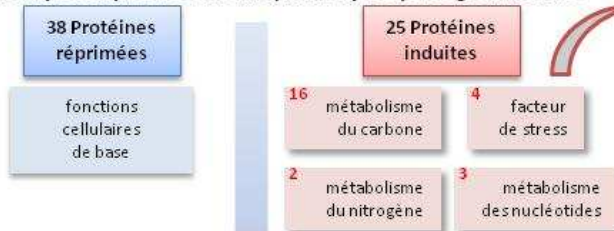


2. La perméase à lactose joue un rôle dans la colonisation du TD



3. Augmentation de la glycolyse dans le TD

Profil protéique de *S. thermophilus* après passage dans le TD



Protéines induites après passage dans le TD

	Ino-LMD9 ^{lac}	Protéines communes	Ino-LMD9
Métabolisme du carbone	9	7	1
Facteurs de stress	1	3	-
Métabolisme du nitrogène	2	-	-
Métabolisme des nucléotides	3	-	-

Augmentation de la glycolyse dans le TD

Production de 49.9 mM de L-lactate

Le lactose stimule la glycolyse dans le TD

4. Au niveau de l'hôte...

- Pas d'effet de *S. thermophilus* sur la profondeur des cryptes
- Induction de transporteurs de mono-carboxylates
- Induction de la protéine d'arrêt du cycle cellulaire p27^{Kip1} des colonocytes

	Ino-LMD9 ^{lac}	Ino-LMD9
SLC16a1	1.8*	2.2*
SLC5a8	1.6*	1.7*
p27 ^{Kip1}	1.8*	1.8*

Homéostasie au niveau du colon

Le lactose stimule l'activité glycolytique de *S. thermophilus* dans le TD

→ Importance de la matrice alimentaire

Figure 30 : Schéma de synthèse des principaux résultats

4 Discussion générale

Ce travail apporte une meilleure connaissance de l'impact de l'introduction d'une source de carbone directement assimilable par la bactérie, et qui de plus est son sucre préférentiel, sur le niveau de la colonisation de l'hôte, l'adaptation au TD et son activité métabolique (Figure 30 : schéma de synthèse des principaux résultats).

L'apport de lactose à 45 g/L a permis d'augmenter la colonisation du TD et donc probablement d'améliorer et d'accélérer l'adaptation de *S. thermophilus*. Il a aussi permis d'augmenter le niveau de colonisation. Le lactose a également un effet stimulateur indépendamment de la perméase à lactose. Néanmoins, cet effet semble être particulier à *S. thermophilus* car l'apport de lactose n'a pas d'effet significatif sur la stimulation de la colonisation du TD de souris axéniques par *Lactococcus lactis* qui se stabilise à $3.7 \cdot 10^9$ UFC/g de fèces (en présence ou non de lactose) (Roy *et al.*, 2008a).

Nous avons montré précédemment que l'adaptation au TD de *S. thermophilus* passait par une augmentation de la glycolyse. L'apport de lactose stimule davantage la glycolyse avec une induction deux fois plus importante de protéines impliquées dans le métabolisme du carbone et plus particulièrement le galactose, le sucrose et le glycogène. Nous avons observé une induction de certaines protéines similaires chez *S. thermophilus* et *L. lactis* dans le TD lorsqu'il y a un apport de lactose telles que : GapA et GalE (Roy *et al.*, 2008a). Il a été démontré *in vitro* que le gène *lacZ* est activé suite à l'apport de lactose dans le TD (Drouault *et al.*, 2002) et *in vivo* que *S. thermophilus* produit une β -galactosidase active (Mater *et al.*, 2006). Nous avons observé que *S. thermophilus* induit une glycolyse plus importante en présence de lactose dans le TD. Toutefois, cette production importante de L-lactate ne semble pas induire une réponse de l'hôte proportionnelle à la quantité de lactate présente dans le TD. En effet, en comparant le taux d'induction des transporteurs de monocarboxylates et la protéine d'arrêt du cycle cellulaire p27^{kip1} chez les rats ayant reçu du lactose ou non, nous observons le même niveau de réponse chez l'hôte. Ainsi, l'apport de lactose a un impact sur la physiologie de *S. thermophilus* sans pour autant affecter les réponses que nous avons étudié chez l'hôte, mettant en évidence l'homéostasie au niveau de l'intestin.

Cette étude a aussi permis de mettre en évidence l'induction *in vivo* de certaines protéines par un apport nutritionnel particulier. Cette stratégie permet une meilleure connaissance des bactéries à effets probiotiques lorsqu'elles sont incorporées dans des

aliments contenant leurs nutriments. Le yaourt constitue un modèle de choix afin d'étudier l'effet que pourrait avoir *S. thermophilus* sur l'hôte lorsqu'il est consommé. Il présente à la fois un écosystème simple et une teneur en lactose de 45 g/L qui a un impact sur la physiologie et plus particulièrement sur le métabolisme du carbone de *S. thermophilus*.

Chapitre 3 : Devenir des deux bactéries du yaourt dans le TD

1 Introduction

Ces dernières années, de nombreuses études ont porté sur les allégations santé du yaourt et des cultures bactériennes utilisées pour la production de laits fermentés. Les avantages du yaourt et des BL sur la santé ont été étudiés dans des modèles animaux et, parfois, chez des sujets humains (Aldinucci *et al.*, 2002; Del Campo *et al.*, 2005; Saavedra *et al.*, 2004). Ces bactéries sont capables de résister partiellement aux sécrétions gastriques et biliaires *in vitro* et *in vivo* (Faye *et al.*, 2011; Kimoto-Nira *et al.*; Lo Curto *et al.*, 2011; Pitino *et al.*, 2010; Tiiu Kullisaar, 2003) et peuvent délivrer des enzymes actives et autres substances dans l'intestin (Drouault *et al.*, 2002; Mater *et al.*, 2005; Oozeer *et al.*, 2002; Oozeer *et al.*, 2005). Certaines études portant sur le yaourt, les laits fermentés par différentes espèces de BL, ou les deux en même temps ont montré des bénéfices prometteurs pour la santé dans le cas de certaines affections gastro-intestinales, la constipation, les maladies diarrhéiques, le cancer du côlon, les maladies inflammatoires de l'intestin, les infections à *Helicobacter pylori*, et les allergies (voir introduction ; chapitre 3). En particulier, l'effet probiotique qui a été attribué par l'EFSA au yaourt concerne l'amélioration de la digestion du lactose chez certaines personnes intolérantes au lactose. L'incapacité à digérer le lactose, cause de l'intolérance au lactose chez l'homme, a été attribuée à des quantités insuffisantes de la lactase intestinale. L'activité de la β -galactosidase microbienne, à savoir la dégradation du lactose, est d'autant plus importante dans le cas du yaourt. En effet, l'activité conjointe de *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* en co-culture est plus importante que l'activité propre de *S. thermophilus* ou de *L. bulgaricus* ou que celle d'autres bactéries lactiques telle que *Lactobacillus acidophilus* dans d'autres produits laitiers fermentés (Onwulata *et al.*, 1989; Savaiano *et al.*, 1984). Cette activité conjointe (et plutôt) exclusive renforce l'attribution de l'allégation santé au yaourt. Mais qu'en est-il quant à la viabilité de *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* dans le TD (afin d'exercer leurs effets)? Des travaux ont porté sur l'avenir de ces deux bactéries une fois le yaourt consommé c.à.d. dans le TD. Les résultats de ces études ne sont pas homogènes quant à la survie, l'implantation et l'activité métabolique de *S. thermophilus* et *L. bulgaricus*.

Ainsi, dans le troisième chapitre de ce manuscrit, afin d'étudier ces deux bactéries dans un modèle simplifié, nous nous sommes intéressés au devenir de *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* dans le TD de rats gnotobiotiques. Cette étude a fait l'objet d'un article (soumis) ainsi que de résultats complémentaires.

***Streptococcus thermophilus* LMD-9 est avantagé sur *Lactobacillus delbrueckii* ssp.
bulgaricus ATCC11842 dans différents milieux et dans le tractus digestif de rats
gnotobiotiques**

2.1 Contexte et objectifs

L'écosystème du yaourt repose sur les interactions prenant place entre *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* dans un milieu laitier. L'association de ces deux espèces est souvent bénéfique mais pas indispensable à la croissance de chaque espèce dans le lait (Tamime & Robinson, 1999). Les facteurs impliqués dans cette association *in vitro* et qui sont décrits dans la littérature sont essentiellement d'ordre nutritionnel. D'autres facteurs peuvent influencer sur cette association comme la composition de l'inoculum, le pH et la température (Beal & Corrieu, 1991). Dans le TD, les disponibilités en nutriments sont différentes ainsi que les conditions de croissance. Nous supposons donc que cet écosystème « yaourt » sera modulé autrement dans les conditions du TD.

Afin de mieux connaître l'évolution de *S. thermophilus* LMD-9 et de *L. bulgaricus* ATCC11842 dans le TD ainsi que leurs contributions à l'effet du yaourt, nous avons étudié le comportement des deux bactéries *in vitro* et *in vivo* dans un modèle animal. Pour cela, nous avons :

- i) suivi la croissance, l'acidification du milieu (milieu de culture MRS + glucose à 20%, MRS + lactose à 20% ou lait) et la production de lactate de *S. thermophilus* LMD-9 et de *L. bulgaricus* ATCC11842 et ce, en monoculture et en co-culture ;
- ii) suivi la colonisation du TD de rats gnotobiotiques par *L. bulgaricus* avec et sans apport de lactose dans l'eau de boisson des rats (45g/L) ;
- iii) suivi la colonisation du TD de rats gnotobiotiques par une co-culture de *S. thermophilus* LMD-9 et de *L. bulgaricus* ATCC11842 en apportant du lactose dans l'eau de boisson des rats (45g/L).

2.2 Méthodes

Cette étude comporte deux parties.

Tableau 18 : Protocole expérimental d'inoculation des rats avec du lait fermenté avec *L. bulgaricus* ATCC11842

	Sans apport de lactose	Avec apport de lactose à 45g/L
Nombre de rats axéniques âgés de 2 mois	4	4
Inoculations avec <i>L. bulgaricus</i> ATCC11842	1 mL ($8 \cdot 10^6$ UFC/mL) à j 1	1 mL ($8 \cdot 10^6$ UFC/mL) à j 1 1 mL ($8 \cdot 10^7$ UFC/mL) à j 19

Tableau 19 : Protocole expérimental d'inoculation des rats avec du lait fermenté avec une co-culture de *S. thermophilus* LMD-9 et *L. bulgaricus* ATCC11842

	1 gavage	3 gavages
Nombre de rats axéniques âgés de 2 mois inoculés avec :	8	8
<i>L. bulgaricus</i> ATCC11842	1 mL ($3.7 \cdot 10^7$ UFC/mL) à j 1	1 mL ($3.7 \cdot 10^7$ UFC/mL) à j 1 1 mL ($3.7 \cdot 10^7$ UFC/mL) à j 2 1 mL ($2.2 \cdot 10^7$ UFC/mL) à j 8
<i>S. thermophilus</i> LMD-9	1 mL ($3.2 \cdot 10^9$ UFC/mL) à j 1	1 mL ($9.2 \cdot 10^9$ UFC/mL) à j 1 1 mL ($4.5 \cdot 10^8$ UFC/mL) à j 2 1 mL ($1 \cdot 10^8$ UFC/mL) à j 8

Tableau 20 : Population finale, pH et teneur en lactate des différents milieux de culture après croissance de *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* en monoculture et en co-culture.

	MRS + glucose 20%	MRS + lactose 20%	Lait
Monoculture <i>S. thermophilus</i> LMD-9	$1.9 \cdot 10^8$ UFC/mL pH = 4.5 45.8 mM L-lactate	$1.7 \cdot 10^8$ UFC/mL pH = 4.5 44.3 mM L-lactate	$6.6 \cdot 10^8$ UFC/mL pH = 4.8 43.1mM L-lactate
Monoculture <i>L. bulgaricus</i> ATCC 11842	$5.1 \cdot 10^8$ UFC/mL pH = 4.2 50.7 mM D-lactate	$4.6 \cdot 10^8$ UFC/mL pH = 4.2 51.1 mM D-lactate	$6.7 \cdot 10^8$ UFC/mL pH = 4.5 27.1 mM L-lactate
Co-culture <i>S. thermophilus</i> LMD-9	$2.8 \cdot 10^8$ UFC/mL pH = 4.45 43.5 mM L-lactate	$3.7 \cdot 10^8$ UFC/mL pH = 4.44 41.5 mM L-lactate	$8.73 \cdot 10^8$ UFC/mL pH = 4.65 42.6 mM L-lactate
Co-culture <i>L. bulgaricus</i> ATCC11842	$7.87 \cdot 10^7$ UFC/mL pH = 4.45 9.78 mM D-lactate	$1.12 \cdot 10^8$ UFC/mL pH = 4.44 11.7 mM D-lactate	$2.87 \cdot 10^7$ UFC/mL pH = 4.65 1.6 mM D-lactate

- En premier lieu, nous avons suivi pendant 7 heures la croissance de *S. thermophilus* LMD-9 et *L. bulgaricus* ATCC11842 à 42°C en monoculture et en co-culture et ce dans trois milieux différents (MRS + 20% de glucose, MRS + 20% de lactose et en lait). Nous avons inoculé chaque milieu avec *S. thermophilus* LMD-9 ou *L. bulgaricus* ATCC11842 à 10^6 UFC/mL dans les cas de monoculture ou les deux espèces en même temps à un niveau de 10^6 UFC/mL dans le cas de la co-culture. En parallèle, nous avons mesuré l'acidification du milieu. En fin de croissance, nous avons mesuré le lactate produit dans les différents milieux.

- En second lieu, nous avons suivi pendant 4 semaines la colonisation du TD de rats par *L. bulgaricus* ATCC11842 et ce, avec et sans apport de lactose dans l'eau de boisson (45g/L) comme indiqué dans le tableau 18.

Puis nous avons suivi pendant 4 semaines la colonisation du TD de rats par une co-culture de *S. thermophilus* LMD-9 et *L. bulgaricus* ATCC11842 avec apport de lactose dans l'eau de boisson (45g/L) comme indiqué dans le tableau 19 :

Après 4 semaines de suivi de la colonisation du TD des différents modèles de rats obtenus, nous avons mesuré le pH et le lactate dans le contenu caecal des rats gnotobiotiques.

2.3 Principaux résultats

In vitro :

- En monoculture, *L. bulgaricus* a le même niveau de croissance que *S. thermophilus* dans les 3 milieux de culture. Par contre, en co-culture *S. thermophilus* a une meilleure croissance et il est encore plus avantageux lors de croissance en lait (voir tableau 20).
- *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* produisent exclusivement et respectivement du L-lactate et du D-lactate.

In vivo :

- *L. bulgaricus* ne colonise pas le TD en absence de lactose. Lorsqu'il y a un apport de lactose dans l'eau de boisson des rats (45g/L), *L. bulgaricus* colonise le TD des rats mono-associés à $1 \cdot 10^7$ UFC/g de fèces et produit exclusivement du D-lactate à hauteur de 15.2 mM dans le contenu caecal après 4 semaines de colonisation.
- Lorsque les rats sont inoculés avec une co-culture de *S. thermophilus* et *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* colonise le TD à 10^{10} UFC/g de fèces dès la première semaine et ce,

dans le cas d'un ou trois gavages successifs. *L. bulgaricus* est détecté chez 3 rats sur 8 à $5 \cdot 10^7$ UFC/g de fèces dans le cas d'un seul gavage et chez 2 rats sur 8 et ce, entre 10^2 UFC/g et 10^5 UFC/g de fèces dans le cas de 3 gavages successifs. Chez les autres rats, *L. bulgaricus* est au-dessous du seuil de détection de 10^2 UFC/g de fèces. Chez les rats di-associés avec *S. thermophilus* et *L. bulgaricus*, le contenu caecal est à pH 6.3 et contient 30 mM de L-lactate et 4 mM de D-lactate. Cette production de lactate est en accord avec le niveau de chaque population bactérienne présente dans le TD des rats.

2.4 Conclusion

Ce travail a permis de caractériser la relation et l'activité des deux bactéries du yaourt dans des modèles simplifiés aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. *In vitro*, en co-culture, *S. thermophilus* est avantagé par rapport à *L. bulgaricus*. Cet avantage peut être lié à la compétitivité de *S. thermophilus*, en particulier à sa capacité à synthétiser des nutriments azotés et au fait que *L. bulgaricus* soit auxotrophe pour la majorité des acides aminés (Van De Guchte *et al.*, 2006).

In vivo, le lactose est indispensable à la colonisation du TD de rats axéniques par *L. bulgaricus*. Dans le TD de rats di-associés, *S. thermophilus* est aussi avantagé par rapport à *L. bulgaricus*. Nous avons montré qu'*in vivo* *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* produisent exclusivement et respectivement du L-lactate et du D-lactate comme ce qui a été observé *in vitro*. Etant donné son avantage numérique, son importante capacité d'adaptation au TD et sa production de lactate, *S. thermophilus* pourrait contribuer majoritairement aux propriétés du yaourt.

***Streptococcus thermophilus* LMD-9 is advantaged over *Lactobacillus bulgaricus* ATCC11842 *in vitro* and in the digestive tract of gnotobiotic rats**

Leila Ben-Yahia, Camille Mayeur, Françoise Rul and Muriel Thomas.
INRA, UMR1319 Micalis, F-78350 Jouy-en-Josas, France
AgroParisTech, UMR Micalis, F-78350 Jouy-en-Josas, France
Corresponding authors: Muriel Thomas and Françoise Rul
E-mail: muriel.thomas@jouy.inra.fr and francoise.rul@jouy.inra.fr
Phone number: +33 1 34652835 Fax: +33 1 34652462

Abstract

Yogurt bacteria, *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, are alleged to have beneficial effects on human health. Our objective was to characterize the growth and the metabolic activity of the two yogurt bacteria in simplified environments, *in vitro* and *in vivo*.

S. thermophilus LMD-9 and *L. bulgaricus* ATCC11842 were monitored in different synthetic media and in gnotobiotic rat gastro-intestinal tract (GIT). *In vitro*, and particularly in milk, *S. thermophilus* had a growth selective advantage at the expense of *L. bulgaricus*. *In vivo*, *L. bulgaricus* did not efficiently colonize GIT of germ free rats in absence of lactose. When germ-free rats were inoculated with a mixture of two yogurt bacteria and lactose (45g/L), *S. thermophilus* showed a rapid and maximal colonization (10^{10} CFU/g of faeces) at the expense of *L. bulgaricus* which remained in most cases below $<10^2$ CFU/g of faeces. Furthermore, we showed that *S. thermophilus* specifically produced L-lactate, while *L. bulgaricus* produced only D-lactate, both *in vitro* and *in vivo*.

Considering its competitive and numerical advantages, its capacity to adapt and to produce L-lactate in the rat GIT, *S. thermophilus* could be the major contributor to the health effects of yogurt.

Key words: D- & L- lactates, gut, lactic acid bacteria, lactose, yogurt.

1 Introduction

Yogurt is defined by the WHO and FAO (1975) as a milk fermented with two thermophilic lactic acid bacteria (LAB): *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*) and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (*L. bulgaricus*). Upon yogurt consumption, these bacterial species transit through the gastro-intestinal tract (GIT) and encounter the residual intestinal microbiota. Even though *S. thermophilus* and *L. bulgaricus* do not belong to the dominant group of bacteria that constitutes the core of the microbial community of healthy humans (Tap *et al.*, 2009), they remain as sub-dominant species like other lactic acid bacteria (Firmesse *et al.*, 2008; Furet *et al.*, 2009; Joly *et al.*, 2010; Tap *et al.*, 2009). In European adults, species that have sequences 90% similar to the *S. thermophilus* genome are present at low levels in fecal samples (Qin *et al.*, 2010) and *S. thermophilus* has been detected in breast milk of mothers and infant faeces (Perez *et al.*, 2007). Whether these two bacteria are boosted or not in the GIT after yogurt ingestion remains a question, since results depend on the studies, as summarized in table 1.

Table 1: Synthesis of studies on gut colonization by yogurt bacteria.

Humans	References
Lack of survival of yogurt bacteria in the faeces and in the upper gastrointestinal tract after 2 consecutive weeks of daily consumption of commercially produced fresh yogurt.	(Del Campo <i>et al.</i> , 2005)
Yogurt bacteria, especially <i>L. bulgaricus</i> , can be retrieved from the faeces of healthy individuals after the ingestion of commercial yogurt twice a day for 1 week.	(Elli <i>et al.</i> , 2006)
Substantial numbers of <i>S. thermophilus</i> and <i>L. bulgaricus</i> can survive human gastrointestinal transit after a consumption of 3 fresh yogurts daily for 12 days.	(Mater <i>et al.</i> , 2005)
<i>S. thermophilus</i> was not found after a consumption of 3 daily fresh yogurts during 15 or 30 days.	(Ballesta <i>et al.</i> , 2008)
Animals	
Yogurt bacteria are detected in the stomach, the jejunum and the duodenum 3 hours after yogurt ingestion in rats.	(Goodenough and Kleyn, 1976)
<i>S. thermophilus</i> is detected in the intestinal contents of Göttingen minipigs from 3 to 10 h after yogurt ingestion.	(Lick <i>et al.</i> , 2001)
<i>S. thermophilus</i> and <i>L. bulgaricus</i> were undetectable or intermittently just over the limit of detection in the cases of a single or multiple gavages of gnotobiotic mice.	(McNulty <i>et al.</i> , 2011)

These discrepancies can be explained by i) different protocols of yogurt consumption, ii) the sensitivity threshold of the techniques used to detect the bacteria in faeces, iii) the inter-individual diversity of microbiota described in Humans, iv) the complex interactions characterizing the network between micro-organisms, nutrition and host.

Despite the low amount of yogurt bacteria in the human GIT, their biological and nutritional relevance is recognized. Indeed, the fact that yogurt consumption improves lactose digestion in lactose-intolerant individuals is attributed to the metabolic activity of yogurt bacteria (EFSA, 2010). The deficiency of the intestinal lactase (which hydrolyzes lactose) is alleviated by the activity of bacterial β -galactosidase (Drouault *et al.*, 2002). Lactose, which is present in yogurt at up to 45 g/L, improves the beneficial effects of yogurt because it enhances the activity of β -galactosidase of bacteria (Hertzler and Savaiano, 1996; Pribila *et al.*, 2000).

By using gnotobiotic rats, we have recently studied the metabolic activity of *S. thermophilus* in the GIT (Rul *et al.*, 2011). The adaptation of *S. thermophilus* in the rat GIT induces its glycolysis pathway leading to formation of lactate that serves as a biological signal recognized by the colon epithelium. Moreover, the presence of lactose improves *S. thermophilus* colonization and favours its glycolytic activity and lactate production in the GIT (Thomas *et al.*, 2011). Hence, gnotobiotic rats harbouring *S. thermophilus* in the GIT have been useful for better understanding bacterial metabolic orientations and subsequent interactions between this yogurt bacteria and the host.

To better understand how the two yogurt bacteria participate to the yogurt effects, we first studied *S. thermophilus* and *L. bulgaricus* in different *in vitro* experimental conditions to determine the specific behaviour of both bacteria, in pure or mixed cultures. This represents an essential prerequisite to study the two yogurt bacteria *in vivo*, i.e in the GIT environment. We monitored the growth and the metabolic activities of *S. thermophilus* LMD-9 and *L. bulgaricus* ATCC11842 in synthetic media - in pure or mixed cultures - and in the GIT of

gnotobiotic rats. We showed that i) in the GIT as well as *in vitro*, *S. thermophilus* specifically produced L-lactate, while *L. bulgaricus* produced D-lactate, ii) the presence of lactose was required for an efficient colonization of *L. bulgaricus*, iii) *in vitro* as well as *in vivo* *S. thermophilus* had a selective advantage at the expense of *L. bulgaricus*.

2 Material and methods

2.1 Bacterial strains and culture conditions

The strains *S. thermophilus* LMD-9 (ATCC BAA-491) (BCCG collection, Belgium) and *L. bulgaricus* ATCC11842 (ATCC collection, USA) were used.

In vitro cultures of *S. thermophilus* and *L. bulgaricus* were prepared in different media: MRS (Difco, le Pont de Claix, France) glucose (20g/L), MRS lactose (20g/L) and 10% (w/v) Nilac skimmed milk (NIZO, Ede, The Netherlands). Cultures were inoculated at 0.05 OD_{600nm} with over-night pre-cultures and incubated at 42°C. Milk cultures were stopped after 4 hours of incubation (due to the coagulation of milk) while MRS cultures were stopped after 7 hours of incubation; in these conditions the bacteria are at the end of the exponential phase. The cultures were enumerated *a posteriori* by plating appropriate dilutions on M17 (Difco) agar lactose (10 g/L) for *S. thermophilus* or on acidified MRS agar lactose (20 g/L) (pH 5.2) for *L. bulgaricus*. After 16 h (*S. thermophilus*) or 24 h (*L. bulgaricus*) incubation at 42°C under anaerobiosis (Anaerocult A, Merck, Darmstadt, Germany), colonies were counted. All culture experiments were performed in triplicate.

For *in vivo* experiments, cultures of *S. thermophilus* LMD-9 and *L. bulgaricus* ATCC11842 were prepared in reconstituted 10% (w/v) Nilac skimmed milk as described previously (Rul *et al.*, 2011). *S. thermophilus*/*L. bulgaricus* co-cultures and *L. bulgaricus* monocultures were obtained by inoculating Nilac milk with 10⁶ CFU/ml of cultures of each species and incubated

at 42°C until pH 5.4–5.5 (pH of coagulation of milk); the cultures were enumerated *a posteriori* as described above.

2.2 Animals and Experimental Design

All procedures were carried out according to European and French guidelines for the care and use of laboratory animals (permission 78-123, dedicated to M.T.).

At the age of 2 months, germ-free (GF) rats (male, Fisher 344) were inoculated either with a mix of *S. thermophilus* and *L. bulgaricus* (Ino-LMD9+Lb, $n = 16$) or with *L. bulgaricus* ATCC11842 (Ino-Lb, $n = 8$) according to the following protocol. For di-associated rats, 1 ml of a co-culture *S. thermophilus* (3.2×10^9 CFU/ml) and *L. bulgaricus* (3.7×10^7 CFU/ml) were inoculated to 16 GF rats by oral gavage (Ino-LMD-9+Lb). A group of 8/16 rats received 2 additional inoculations on days 2 and 8 with, respectively, (4.5×10^8 *S. thermophilus* + 3.7×10^7 *L. bulgaricus* CFU/ml) and (1×10^8 *S. thermophilus* + *L. bulgaricus* 2.2×10^7 CFU/ml). These rats received lactose (45g/L) in sterile drinking water. For mono-associated rats, 8 rats were inoculated with 1 ml of a *L. bulgaricus* milk culture (8×10^6 CFU/ml) (Ino-Lb). 4/8 rats received lactose (45g/L) in sterile drinking water. The other 4 rats received sterile water and a second oral inoculation with 1 ml of a *L. bulgaricus* milk culture (8×10^7 CFU/ml) at day 19. Rats were housed in sterile Plexiglas isolators (Ingénia, Vitry-sur-Seine, France). All groups of rats received the same standard diet (UAR, Villemoisson, France) which was sterilized by γ -irradiation. Throughout the experiment and twice a week in the case of Ino-LMD-9+Lb, *L. bulgaricus* and *S. thermophilus* were enumerated by plating. The faeces were diluted in 10 volumes of M17 or MRS and vigorously vortexed with sterile glass beads (3.5-mm diameter), and bacteria were enumerated as described above. All results are expressed as $\log_{10}$ (CFU/g faeces).

2.3 D- and L-Lactate assays

D- and L-lactate were measured in the supernatant of bacterial cultures. All cultures were centrifuged at 4500 x g for 10 minutes. One ml of culture supernatant was precipitated with trichloroacetic acid (10%) and centrifuged at 4500 x g for 20 min at 4 °C. D- and L-lactate were measured in these TCA-supernatants with Biosentec D/L-lactic acid enzymatic kits according to the manufacturer's instructions (Biosentec, Toulouse, France). For D- and L-lactate measurements in caecal contents, we proceeded as described by (Rul *et al.*, 2011). Results are expressed in mM or in percentage of total lactate.

2.4 Statistical analysis

Bacterial populations, lactate production and pH values are presented as means $\pm$ SE. Comparisons of group data were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) (GraphPad PRISM Version 5.03). Differences were considered as statistically different at $P < 0.01$.

3 Results

3.1 *S. thermophilus* and *L. bulgaricus* growth and metabolic activities *in vitro*

We first studied the two yogurt bacteria *in vitro* to better understand how they behave when they are associated as the interactions are strain dependant. Thus, the growth of *S. thermophilus* and *L. bulgaricus* in mono-culture was studied in synthetic medium, which allows the growth of both bacteria, supplemented with glucose (MRS^{+glu}) or with lactose (MRS^{+lac}). In each condition, the kinetics and growth rate, the final population of bacteria, the resulting pH and the production of L- and D-lactate were monitored (Figure 1: Bacterial growth and metabolic activities *in vitro*). *S. thermophilus* showed the same kinetics and growth rate ($0.65 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$ and $0.62 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$) and reached the same level of population after 7 hours of growth, *i.e.* $1.9 \pm 0.3 \cdot 10^8$ and $1.7 \pm 0.1 \cdot 10^8$ CFU/mL, in MRS^{+glu} and MRS^{+lac}, respectively (Figure 1A, B and C) and acidified both media to $\text{pH } 4.5 \pm 0.03$ (Figure 1D).

Concordantly, *S. thermophilus* produced similar levels of L-lactate in both media, *i.e.* 45.8 ± 1.6 mM in MRS^{+glu} and 44.3 ± 1.6 mM in MRS^{+lac}, with no significant production of D-lactate (Figure 1E and F). *L. bulgaricus* showed the same kinetics and growth rate (0.57 ± 0.007 h⁻¹ and 0.64 ± 0.004 h⁻¹) in MRS^{+glu} and MRS^{+lac}, respectively (Figure 1A and B). This bacteria reached the same population in both media, (5.1 ± 0.4 10⁸ in MRS^{+glu} and 4.6 ± 0.8 10⁸ CFU/mL in MRS^{+lac}), correlatively produced the same level of D-lactate (50.7 ± 1.2 mM in MRS^{+glu} and 51.1 ± 7.2 mM in MRS^{+lac}), and acidified both media at pH 4.2 ± 0.1 (Figure 1C, D, E and F). These data indicate that each bacterium displayed similar growth rates and metabolic activities in the presence of glucose or lactose in MRS.

In milk, the final population of *S. thermophilus* was higher than in MRS with final populations of 6.6 ± 0.1 10⁸ vs 1.8 ± 0.2 10⁸ CFU/mL (mean of final populations in MRS^{+glu} and MRS^{+lac}) (Figure 1C). Despite this higher population, the acidification was lower in milk with pH 4.8 ± 0.02 vs 4.5 ± 0.03 in MRS ($P < 0.01$) (Figure 1D) that may be due to the buffering capacity of milk. Moreover, the production of L-Lactate was similar in milk compared to MRS suggesting a different metabolic activity of *S. thermophilus* in milk. In contrast, the final population of *L. bulgaricus* was at the same level in MRS and milk. In milk, the growth of both bacteria led to similar final populations (6.6 - 6.7 10⁸ CFU/ml).

When the two bacteria were grown in co-culture in MRS^{+glu}, MRS^{+lac} and in milk, we observed a final predominant population of *S. thermophilus* at the expense of *L. bulgaricus* despite the same initial levels of inoculation of each bacterium (10⁶ CFU/mL). Indeed, in MRS, *S. thermophilus* predominated over *L. bulgaricus* by factors of 3.3 (MRS^{+glu}) and 3.6 (MRS^{+lac}). In milk, these factors were enhanced with 300 fold more *S. thermophilus* (8.7 ± 0.4 10⁹ CFU/mL) than *L. bulgaricus* (2.9 ± 0.1 10⁷ CFU/mL) (Figure 1C). When the two bacteria grew in milk, they produced respectively 42.6 ± 1.5 mM L-lactate and 1.6 ± 0.3 mM D-lactate (Figure 1E and F). Therefore L-lactate represented the majority of total lactates produced in

co-cultures (80% in MRS, 98% in milk) (Figure 1G) which was related to the dominance of *S. thermophilus*.

Though *L. bulgaricus* showed a higher final population in mono-culture in MRS than *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* was systematically disadvantaged when it was co-cultivated in the presence of *S. thermophilus*. The selective numerical advantage of *S. thermophilus* was greater in milk than in MRS media.

3.2 *S. thermophilus* and *L. bulgaricus* colonization and metabolic activities in vivo

(Figure 2: Numeration of yogurt bacteria in GIT)

L. bulgaricus was administrated in germ free rats receiving lactose (45g/L) or not, thus leading to Ino-Lb (n=4) and Ino-Lb^{+lac} (n=4) mono-associated rats (Figure 2A and 2B). In the absence of lactose, *L. bulgaricus* did not efficiently colonize the GIT even after a second gavage (day 19). In contrast, when rats received lactose in their drinking water, *L. bulgaricus* colonized up to $1 \pm 0.2 \cdot 10^7$ CFU/g of faeces and produced 15.2 ± 4.7 mM D-lactate on day 26. This demonstrates that lactose was essential for the colonization of *L. bulgaricus* which produced D-lactate in GIT.

S. thermophilus and *L. bulgaricus* were co-cultivated in milk and then inoculated in germ free rats (n=8). The milk inoculum was composed of $3.2 \cdot 10^9$ CFU *S. thermophilus* and $3.7 \cdot 10^7$ CFU *L. bulgaricus*, which is coherent with the bacterial relative amount obtained *in vitro* (Figure 1C) and reflects the dominance of *S. thermophilus* in yogurt. When a co-culture was inoculated in rats which did not receive lactose, *S. thermophilus* progressively colonized the GIT while *L. bulgaricus* was never detected in the faeces (Rul *et al.*, 2011).

When rats were inoculated with one co-culture and drank water supplemented with lactose (45g/L) throughout the experiment (Figure 2C), *S. thermophilus* colonized the GIT in all 8 rats and reached up to 10^{10} CFU/g of faeces from the first week. In the 8 rats, *S. thermophilus* maintained its level of population during the four weeks showing a homogeneous and stable colonization. *L. bulgaricus* was detected in 3 out of 8 rats at a mean

of 5×10^7 CFU/g of faeces and remained undetectable (below 10^2 CFU/g of faeces) in the other 5 rats. When rats received 3 successive gavages with a co-culture (day 1, 2, and 8), *S. thermophilus* (Figure 2D) reached 10^{10} CFU/g in the faeces of all rats. Hence, the increasing number of gavages did not further enhance the colonization of *S. thermophilus*. During the first two weeks where the 3 gavages were made, *L. bulgaricus* was detected in all rats at different levels, ranging from $<10^2$ CFU/g to 10^5 CFU/g. At the end of week 4, *L. bulgaricus* was no longer detectable in 6 rats out of 8 and reached a population of 10^4 CFU/g in the faeces of the other 2 rats. These data indicate that *S. thermophilus* showed a rapid and maximal colonization at the expense of *L. bulgaricus* which remained near the detection limit in most cases.

In di-associated rats where *L. bulgaricus* and *S. thermophilus* were detected in the faeces, the ceacum contents were characterized by a pH value of 6.3 ± 0.2 , 30 ± 9 mM L-lactate and 4 ± 1.2 mM D-lactate. L-lactate was thus 7 fold higher than the amount of D-lactate, in accordance with the numeric advantage of *S. thermophilus* over *L. bulgaricus*.

4 Discussion

In the present work, we aimed at answering two questions: do the two yogurt bacteria survive equivalently in a simplified model of the GIT and are they metabolically active in this environment? Hence, we studied these two yogurt bacteria *in vitro* by using different culture media in the presence of different carbon sources and *in vivo* in gnotobiotic rats. In co-culture, *S. thermophilus* was advantaged over *L. bulgaricus* *in vitro* and this predominance was also observed *in vivo*. *S. thermophilus* and *L. bulgaricus* produced, respectively and specifically, L-lactate and D-lactate in different synthetic media as well as in the GIT.

In mono-culture, a higher population of *L. bulgaricus* compared to *S. thermophilus* was obtained in synthetic MRS media whatever the carbon source (glucose or lactose). This

may be explained by the higher proteolytic activity of *L. bulgaricus* (Letort *et al.*, 2002; Sieuwerts *et al.*, 2010) depending on a complex proteolytic system that consists of casein-hydrolyzing proteins, peptide and amino acid transporters and intracellular peptidases. However, in mono-culture in milk, *S. thermophilus* reaches the same level of population as *L. bulgaricus*. The proteolytic activity of the LAB is essential for their growth in milk (Abu-Taraboush *et al.*, 1998; Thomas and Mills, 1981), which is limiting in free amino acids and short peptides. Since the proteolysis activity depends largely on the cell-wall proteinase Prt, our results suggest that the PrtS of *S. thermophilus* is highly adapted to milk casein degradation.

As has been well described so far (Beal *et al.*, 1994; Courtin and Rul, 2004; Herve-Jimenez *et al.*, 2009; Tamime and Robinson, 1999), we confirmed the numerical advantage of *S. thermophilus* over *L. bulgaricus* in milk co-culture. As already known, in milk *S. thermophilus* growth is stimulated by *L. bulgaricus* through its proteolysis activity, in particular via the PrtB proteinase (Courtin and Rul, 2004). This activity leads to the production of peptides that are possibly more efficiently used by *S. thermophilus* than by *L. bulgaricus*. In co-culture, *S. thermophilus* induces several amino acid biosynthesis pathways (arginine, branched-chain amino acids, sulfur amino acids) (Goh *et al.*, 2011; Herve-Jimenez *et al.*, 2009; Sieuwerts *et al.*, 2008) whereas *L. bulgaricus* does not possess the corresponding functional pathways (Van de Guchte *et al.*, 2006). The limitation of *L. bulgaricus* growth observed in co-culture could thus be related to its lesser competitiveness compared to *S. thermophilus* as well as to its lower potential for biosynthesis, for nitrogen nutriment in particular.

In *Lactobacillus* species, it has been proposed that their persistence in the intestinal tract probably proceeds via the regulation of genes involved in transport and metabolism of carbohydrate pathways (Marco *et al.*, 2010; Marco *et al.*, 2009). In the present study, in

mono-associated rats without lactose supplementation, *L. bulgaricus* was not able to colonize the GIT whereas *S. thermophilus* established efficiently (Rul *et al.*, 2011). However in the presence of lactose, *L. bulgaricus* can survive in the GIT. Lactose - the main carbon source in dairy products- is thus an essential factor for *L. bulgaricus* colonization, and a limiting one for *S. thermophilus*. Our results confirm previous studies showing how the presence of lactose in dairy products is a determining factor for the metabolic activity of bacteria in the digestive tract. Indeed, lactose supplementation of mono-associated rodents enhanced the promoter and the activity of the β -galactosidase during the transit of *S. thermophilus* (Mater *et al.*, 2006). In addition, for *Lactococcus lactis* the presence of lactose resulted in a switch in its carbon metabolism (Roy *et al.*, 2008). Overall sugar metabolism is probably central for the life of LAB in the GIT, as we previously showed for *S. thermophilus* (Rul *et al.*, 2011; Thomas *et al.*, 2011).

In the presence of lactose, *L. bulgaricus* reached 5×10^7 CFU/g of faeces, a level that was more than 2 Log lower than that of *S. thermophilus* (10^{10} CFU/g of faeces) (Thomas *et al.*, 2011). This huge difference in colonization levels may be related to different efficiencies in lactose transport because *L. bulgaricus* β -galactosidase is constitutively produced (Germond *et al.*, 2003) and lactose hydrolysis is thus not limiting. Moreover, the high level of colonization of *S. thermophilus* may also be explained by its potential capacity for using galactose (De Vin *et al.*, 2005; Herve-Jimenez *et al.*, 2008), while *L. bulgaricus* cannot metabolize galactose (Germond *et al.*, 2003; Hickey *et al.*, 1986; Turner and Martley, 1983; Van de Guchte *et al.*, 2006). By comparing genome data (Bolotin *et al.*, 2004; Makarova *et al.*, 2006; Van de Guchte *et al.*, 2006), we noticed that *scrB* and *amy*, two genes involved in sucrose metabolism and glucose polymers (starch/glycogen) metabolism, are missing in *L. bulgaricus* while being present in the genome of *S. thermophilus*. Moreover, these two genes are highly expressed by *S. thermophilus* in the GIT (Rul *et al.*, 2011; Thomas *et al.*, 2011). As the rat diet contained

different cereals (wheat, corn, barley) and thus possibly starch and/or glycogen-like carbohydrates, we propose that *S. thermophilus* had an advantage over *L. bulgaricus* *in vivo* thanks to its capacity for using a wider variety of carbohydrate sources.

In the GIT, *L. bulgaricus* and *S. thermophilus* are metabolically active by producing D- and L-lactate, respectively. *L. bulgaricus* is a D-lactate specific producer even if it has 2 genes encoding for L-lactate dehydrogenases (Hao *et al.*, 2011). Lactate modulates the colonic microbial composition by influencing the acidity of luminal content and by favoring the lactate degrader bacteria (Marquet *et al.*, 2009; Veiga *et al.*, 2010). The lactate production could also reduce the pathogen population (Kuisma *et al.*, 2004; Veiga *et al.*, 2010). Recently, we have also proposed that L-lactate may serve as a biological signal to communicate with colon epithelium (Rul *et al.*, 2011). However, intra-luminal concentration of lactate is not always associated with health benefits since high amounts of D-lactate coming from the unbalance between bacterial production and host absorption especially after a massive bowel resection (Joly *et al.*, 2010) may cause neuropathology (Haschke-Becher *et al.*, 2000; Petersen, 2005). In healthy adults, there is no lactate detectable in faecal samples, because lactobacilli are minor groups in microbiota and moreover lactate is degraded by other major bacterial groups (Duncan *et al.*, 2004; He *et al.*, 2008). In healthy individuals, the subsequent risk of acidosis related to D-lactate after ingestion of yogurt does not represent a risk, as it has already been reported (De Vrese and Barth, 1991; De Vrese *et al.*, 1990).

This work provides insight on the relationships and the activities of yogurt bacteria *S. thermophilus* and *L. bulgaricus* in simplified models, both *in vitro* and *in vivo*. Considering its competitive and numerical advantages over *L. bulgaricus*, its capacity to adapt to the rat GIT environment and to produce L-lactate *in vivo*, *S. thermophilus* could be the major contributor to the health effects of yogurt.

Acknowledgments

We thank Niriaina Rasoava for technical assistance and Sylvie Miquel, Julie Tomas, Laura Wrzosek and Claire Cherbuy for fruitful discussion. We thank the team of animal facilities (ANAXEM platform, MICALIS). We thank Syndifrais-CNIEL for their financial support. L. B-Y. is a fellow of the Tunisian government and AlimH division of INRA.

The authors have declared not conflicts of interest.

5 References

- Abu-Taraboush, H.M., Al-Dagal, M.M. and Al-Royli, M.A., 1998. Growth, viability, and proteolytic activity of bifidobacteria in whole camel milk. *J. Dairy Sci.* 81: 354-361.
- Ballesta, S., Velasco, C., Borobio, M.V., Arguelles, F. and Perea, E.J., 2008. Fresh versus pasteurized yogurt: comparative study of the effects on microbiological and immunological parameters, and gastrointestinal comfort. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 26: 552-557.
- Beal, C., Spinnler, H.E. and Corrieu, G., 1994. Comparaison of growth, acidification and productivity of pure and mixed cultures of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* 404 and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 398. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41: 95-98.
- Bolotin, A., Quinquis, B., Renault, P., Sorokin, A., Ehrlich, S.D., Kulakauskas, S., Lapidus, A., Goltsman, E., Mazur, M., Pusch, G.D., Fonstein, M., Overbeek, R., Kyprides, N., Purnelle, B., Prozzi, D., Ngui, K., Masuy, D., Hancy, F., Burteau, S., Boutry, M., Delcour, J., Goffeau, A. and Hols, P., 2004. Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Nat. Biotechnol.* 22: 1554-1558.
- Courtin, P. and Rul, F., 2004. Interactions between microorganisms in a simple ecosystem: yogurt bacteria as a study model. *Lait* 84: 125-134.
- De Vin, F., Radstrom, P., Herman, L. and De Vuyst, L., 2005. Molecular and biochemical analysis of the galactose phenotype of dairy *Streptococcus thermophilus* strains reveals four different fermentation profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 3659-3667.
- De Vrese, M. and Barth, C.A., 1991. Postprandial plasma D-lactate concentrations after yogurt ingestion. *Z. Ernährungswiss* 30: 131-137.
- De Vrese, M., Koppenhoefer, B. and Barth, C.A., 1990. D-lactic acid metabolism after an oral load of DL-lactate. *Clin. Nutr.* 9: 23-28.
- Del Campo, R., Bravo, D., Canton, R., Ruiz-Garbajosa, P., Garcia-Albiach, R., Montesi-Libois, A., Yuste, F.-J., Abaira, V. and Baquero, F., 2005. Scarce Evidence of Yogurt Lactic Acid Bacteria in Human Feces after Daily Yogurt Consumption by Healthy Volunteers. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 547-549.
- Drouault, S., Anba, J. and Corthier, G., 2002. *Streptococcus thermophilus* is able to produce a beta-galactosidase active during its transit in the digestive tract of germ-free mice. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 938-941.
- Duncan, S.H., Louis, P. and Flint, H.J., 2004. Lactate-Utilizing Bacteria, Isolated from Human Feces, That Produce Butyrate as a Major Fermentation Product. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5810-5817.
- EFSA, 2010. Scientific Opinion on lactose thresholds in lactose intolerance and galactosaemia. *EFSA Journal* 8(9):1777: 29 pp.

- Elli, M., Callegari, M.L., Ferrari, S., Bessi, E., Cattivelli, D., Soldi, S., Morelli, L., Goupil Feuillerat, N. and Antoine, J.-M., 2006. Survival of Yogurt Bacteria in the Human Gut. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 5113-5117.
- Firmesse, O., Alvaro, E., Mogenet, A., Bresson, J.L., Lemee, R., Le Ruyet, P., Bonhomme, C., Lambert, D., Andrieux, C., Dore, J., Corthier, G., Furet, J.P. and Rigottier-Gois, L., 2008. Fate and effects of Camembert cheese micro-organisms in the human colonic microbiota of healthy volunteers after regular Camembert consumption. *Int. J. Food Microbiol.* 125: 176-181.
- Furet, J.P., Firmesse, O., Gourmelon, M., Bridonneau, C., Tap, J., Mondot, S., Doré, J. and Corthier, G., 2009. Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR. *FEMS Microbiol. Ecol.* 68: 351-362.
- Germond, J.E., Lapierre, L., Delley, M., Mollet, B., Felis, G.E. and Dellaglio, F., 2003. Evolution of the bacterial species *Lactobacillus delbrueckii*: a partial genomic study with reflections on prokaryotic species concept. *Mol. Biol. Evol.* 20: 93-104.
- Goh, Y.J., Goin, C., O'Flaherty, S., Altermann, E. and Hutkins, R., 2011. Specialized adaptation of a lactic acid bacterium to the milk environment: the comparative genomics of *Streptococcus thermophilus* LMD-9. *Microb. Cell Fact.* 10 Suppl 1: S22.
- Goodenough, E.R. and Kleyn, D.H., 1976. Influence of viable yogurt microflora on digestion of lactose by the rat. *J. Dairy Sci.* 59: 601-606.
- Hao, P., Zheng, H., Yu, Y., Ding, G., Gu, W., Chen, S., Yu, Z., Ren, S., Oda, M., Konno, T., Wang, S., Li, X., Ji, Z.S. and Zhao, G., 2011. Complete sequencing and pan-genomic analysis of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* reveal its genetic basis for industrial yogurt production. *PLoS One* 6: e15964.
- Haschke-Becher, E., Baumgartner, M. and Bachmann, C., 2000. Assay of D-lactate in urine of infants and children with reference values taking into account data below detection limit. *Clin. Chim. Acta.* 298: 99-109.
- He, T., Venema, K., Priebe, M.G., Welling, G.W., Brummer, R.J. and Vonk, R.J., 2008. The role of colonic metabolism in lactose intolerance. *Eur. J. Clin. Invest.* 38: 541-547.
- Hertzler, S.R. and Savaiano, D.A., 1996. Colonic adaptation to daily lactose feeding in lactose maldigesters reduces lactose intolerance. *Am. J. Clin. Nutr.* 64: 232-236.
- Herve-Jimenez, L., Guillouard, I., Guedon, E., Boudebbouze, S., Hols, P., Monnet, V., Maguin, E. and Rul, F., 2009. Postgenomic analysis of *streptococcus thermophilus* cocultivated in milk with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: involvement of nitrogen, purine, and iron metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 2062-2073.
- Herve-Jimenez, L., Guillouard, I., Guedon, E., Gautier, C., Boudebbouze, S., Hols, P., Monnet, V., Rul, F. and Maguin, E., 2008. Physiology of *Streptococcus thermophilus* during the late stage of milk fermentation with special regard to sulfur amino-acid metabolism. *Proteomics* 8: 4273-4286.

- Hickey, M.W., Hillier, A.J. and Jago, G.R., 1986. Transport and metabolism of lactose, glucose, and galactose in homofermentative lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 825-831.
- Joly, F., Mayeur, C., Bruneau, A., Noordine, M.L., Meylheuc, T., Langella, P., Messing, B., Duée, P.H., Cherbuy, C. and Thomas, M., 2010. Drastic changes in fecal and mucosa-associated microbiota in adult patients with short bowel syndrome. *Biochimie* 92: 753-761.
- Kuisma, J., Jarvinen, H., Kahri, A. and Farkkila, M., 2004. Factors associated with disease activity of pouchitis after surgery for ulcerative colitis. *Scand. J. Gastroenterol.* 39: 544-548.
- Letort, C., Nardi, M., Garault, P., Monnet, V. and Juillard, V., 2002. Casein utilization by *Streptococcus thermophilus* results in a diauxic growth in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3162-3165.
- Lick, S., Drescher, K. and Heller, K.J., 2001. Survival of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in the Terminal Ileum of Fistulated Gottingen Minipigs. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4137-4143.
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., Shakhova, V., Grigoriev, I., Lou, Y., Rohksar, D., Lucas, S., Huang, K., Goodstein, D.M., Hawkins, T., Plengvidhya, V., Welker, D., Hughes, J., Goh, Y., Benson, A., Baldwin, K., Lee, J.H., Diaz-Muniz, I., Dosti, B., Smeianov, V., Wechter, W., Barabote, R., Lorca, G., Altermann, E., Barrangou, R., Ganesan, B., Xie, Y., Rawsthorne, H., Tamir, D., Parker, C., Breidt, F., Broadbent, J., Hutkins, R., O'Sullivan, D., Steele, J., Unlu, G., Saier, M., Klaenhammer, T., Richardson, P., Kozyavkin, S., Weimer, B. and Mills, D., 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 103: 15611-15616.
- Marco, M.L., De Vries, M.C., Wels, M., Molenaar, D., Mangell, P., Ahrne, S., De Vos, W.M., Vaughan, E.E. and Kleerebezem, M., 2010. Convergence in probiotic *Lactobacillus* gut-adaptive responses in humans and mice. *ISME J.* 4: 1481-1484.
- Marco, M.L., Peters, T.H., Bongers, R.S., Molenaar, D., Van Hemert, S., Sonnenburg, J.L., Gordon, J.I. and Kleerebezem, M., 2009. Lifestyle of *Lactobacillus plantarum* in the mouse caecum. *Environ. Microbiol.* 11: 2747-2757.
- Marquet, P., Duncan, S.H., Chassard, C., Bernalier-Donadille, A. and Flint, H.J., 2009. Lactate has the potential to promote hydrogen sulphide formation in the human colon. *FEMS Microbiol. Lett.* 299: 128-134.
- Mater, D.D., Bretigny, L., Firmesse, O., Flores, M.J., Mogenet, A., Bresson, J.L. and Corthier, G., 2005. *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* survive gastrointestinal transit of healthy volunteers consuming yogurt. *FEMS Microbiol. Lett.* 250: 185-187.
- Mater, D.D., Drouault-Holowacz, S., Oozeer, R., Langella, P., Anba, J. and Corthier, G., 2006. Beta-galactosidase production by *Streptococcus thermophilus* is higher in the small intestine than in

- the caecum of human-microbiota-associated mice after lactose supplementation. *Br. J. Nutr.* 96: 177-181.
- McNulty, N.P., Yatsunenko, T., Hsiao, A., Faith, J.J., Muegge, B.D., Goodman, A.L., Henrissat, B., Oozeer, R., Cools-Portier, S.p., Gobert, G., Chervaux, C., Knights, D., Lozupone, C.A., Knight, R., Duncan, A.E., Bain, J.R., Muehlbauer, M.J., Newgard, C.B., Heath, A.C. and Gordon, J.I., 2011. The Impact of a Consortium of Fermented Milk Strains on the Gut Microbiome of Gnotobiotic Mice and Monozygotic Twins. *Science Translational Medicine* 3: 106ra106.
- Perez, P.F., Dore, J., Leclerc, M., Levenez, F., Benyacoub, J., Serrant, P., Segura-Roggero, I., Schiffrin, E.J. and Donnet-Hughes, A., 2007. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? *Pediatrics* 119: 724-732.
- Petersen, C., 2005. D-lactic acidosis. *Nutr. Clin. Pract.* 20: 634-645.
- Pribila, B.A., Hertzler, S.R., Martin, B.R., Weaver, C.M. and Savaiano, D.A., 2000. Improved lactose digestion and intolerance among African-American adolescent girls fed a dairy-rich diet. *J. Am. Diet. Assoc.* 100: 524-528; 529-530.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D.R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J.M., Hansen, T., Le Paslier, D., Linneberg, A., Nielsen, H.B., Pelletier, E., Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., Turner, K., Zhu, H., Yu, C., Jian, M., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, X., Qin, N., Yang, H., Wang, J., Brunak, S., Dore, J., Guarner, F., Kristiansen, K., Pedersen, O., Parkhill, J., Weissenbach, J., Bork, P. and Ehrlich, S.D., 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464: 59-65.
- Roy, K., Meyrand, M., Corthier, G., Monnet, V. and Mistou, M.Y., 2008. Proteomic investigation of the adaptation of *Lactococcus lactis* to the mouse digestive tract. *Proteomics* 8: 1661-1676.
- Rul, F., Ben-Yahia, L., Chegdani, F., Wrzosek, L., Thomas, S., Noordine, M.L., Gitton, C., Cherbuy, C., Langella, P. and Thomas, M., 2011. Impact of the metabolic activity of *Streptococcus thermophilus* on the colon epithelium of gnotobiotic rats. *J. Biol. Chem.* 286: 10288-10296.
- Sieuwerts, S., de Bok, F.A., Hugenholtz, J. and van Hylckama Vlieg, J.E., 2008. Unraveling microbial interactions in food fermentations: from classical to genomics approaches. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 4997-5007.
- Sieuwerts, S., Molenaar, D., van Hijum, S.A., Beerthuyzen, M., Stevens, M.J., Janssen, P.W., Ingham, C.J., de Bok, F.A., de Vos, W.M. and van Hylckama Vlieg, J.E., 2010. Mixed-culture transcriptome analysis reveals the molecular basis of mixed-culture growth in *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 7775-7784.
- Tamime, A. and Robinson, R., 1999. *Yoghurt science and technology*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, United Kingdom: (2nd ed.).

- Tap, J., Mondot, S., Levenez, F., Pelletier, E., Caron, C., Furet, J.P., Ugarte, E., Munoz-Tamayo, R., Paslier, D.L., Nalin, R., Dore, J. and Leclerc, M., 2009. Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environ. Microbiol.* 11: 2574-2584.
- Thomas, M., Wrzosek, L., Ben-Yahia, L., Noordine, M.L., Gitton, C., Chevret, D., Langella, P., Mayeur, C., Cherbuy, C. and Rul, F., 2011. Carbohydrate metabolism is essential for the colonization of *Streptococcus thermophilus* in the digestive tract of gnotobiotic rats. *PLoS One* 6(12): e28789.
- Thomas, T. and Mills, O., 1981. Proteolytic Enzymes of Starter Bacteria. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 35: 255-273.
- Turner, K.W. and Martley, F.G., 1983. Galactose fermentation and classification of thermophilic lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1932-1934.
- Van de Guchte, M., Penaud, S., Grimaldi, C., Barbe, V., Bryson, K., Nicolas, P., Robert, C., Oztas, S., Mangenot, S., Couloux, A., Loux, V., Dervyn, R., Bossy, R., Bolotin, A., Batto, J.M., Walunas, T., Gibrat, J.F., Bessieres, P., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D. and Maguin, E., 2006. The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* reveals extensive and ongoing reductive evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 103: 9274-9279.
- Veiga, P., Gallini, C.A., Beal, C., Michaud, M., Delaney, M.L., DuBois, A., Khlebnikov, A., van Hylckama Vlieg, J.E., Punit, S., Glickman, J.N., Onderdonk, A., Glimcher, L.H. and Garrett, W.S., 2010. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* fermented milk product reduces inflammation by altering a niche for colitogenic microbes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 107: 18132-18137.

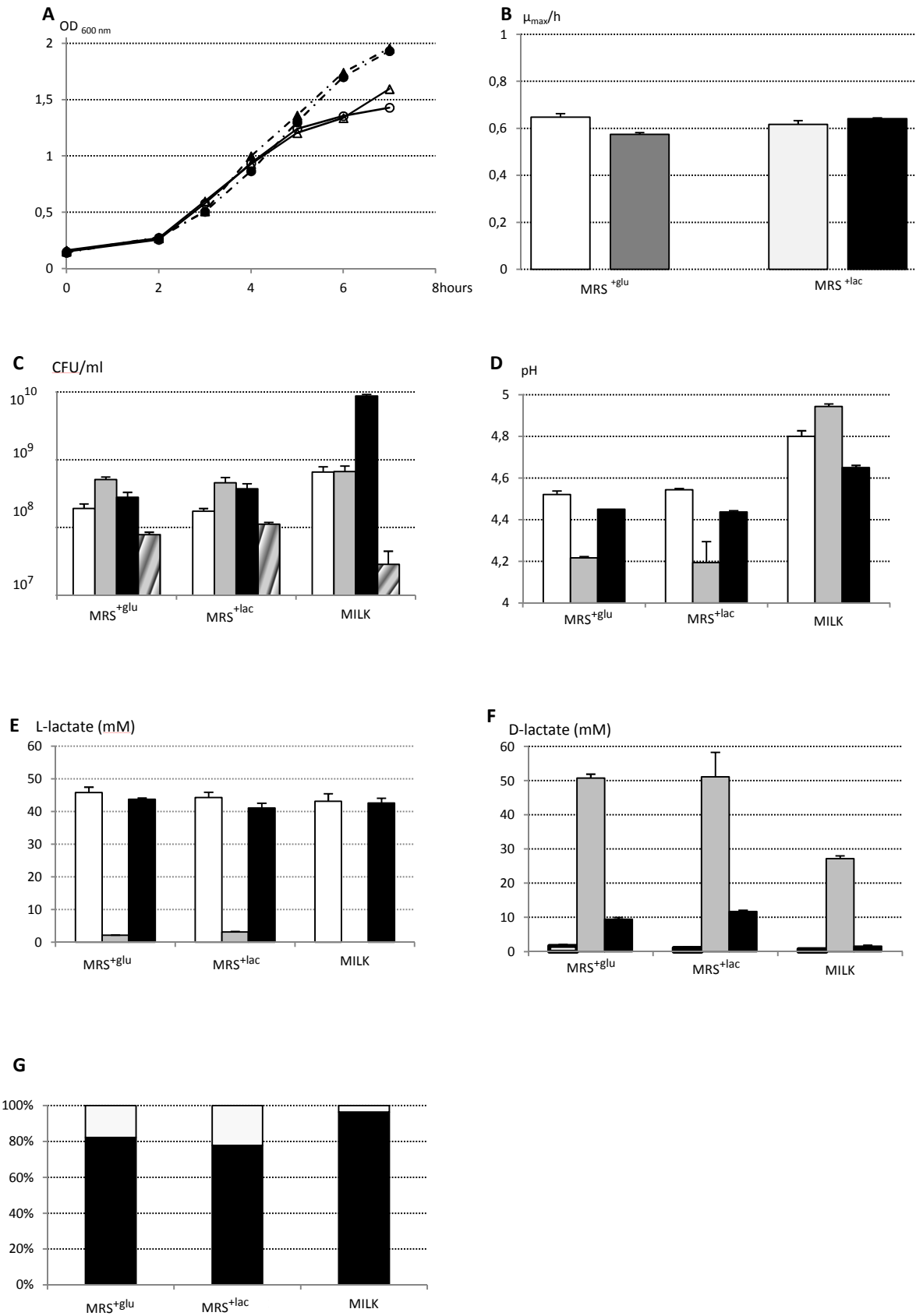


Figure 1: Bacterial growth and metabolic activities *in vitro*

(A): Kinetics of bacterial growth of *S. thermophilus* LMD-9 in MRS^{+glu} (—○—) or in MRS^{+lac} (—▲—) and of *L. bulgaricus* ATCC 11842 in MRS^{+glu} (—●—) or in MRS^{+lac} (—▲—) in mono-culture.

(B): Bacterial growth rate ($\mu_{\max}$ /h) of *S. thermophilus* LMD-9 in MRS^{+glu} □ or in MRS^{+lac} ■ and of *L. bulgaricus* ATCC 11842 in MRS^{+glu} ■ or in MRS^{+lac} ■ in mono-culture.

(C): Bacterial population after growth in MRS^{+glu}, in MRS^{+lac} (7 hours) or in milk (4 hours).

□ *S. thermophilus* LMD-9 in mono-culture, ■ *L. bulgaricus* ATCC 11842 in mono-culture and ■ *S. thermophilus* LMD-9 and ■ *L. bulgaricus* ATCC 11842 in co-culture.

(D): pH of each culture after 7 hours of bacterial growth in MRS and 4 hours of bacterial growth in milk. Of note: initial pHs of the 3 media were similar.

(E) and (F): L- and D-lactate production *in vitro* expressed in mM.

□ *S. thermophilus* LMD-9 mono-culture, ■ *L. bulgaricus* ATCC 11842 mono-culture and

■ *S. thermophilus* LMD-9 - *L. bulgaricus* ATCC 11842 co-cultures.

(G) Lactate production *in vitro* in co-cultures.

■ % of L-lactate and □ % of D-lactate production related to total lactate.

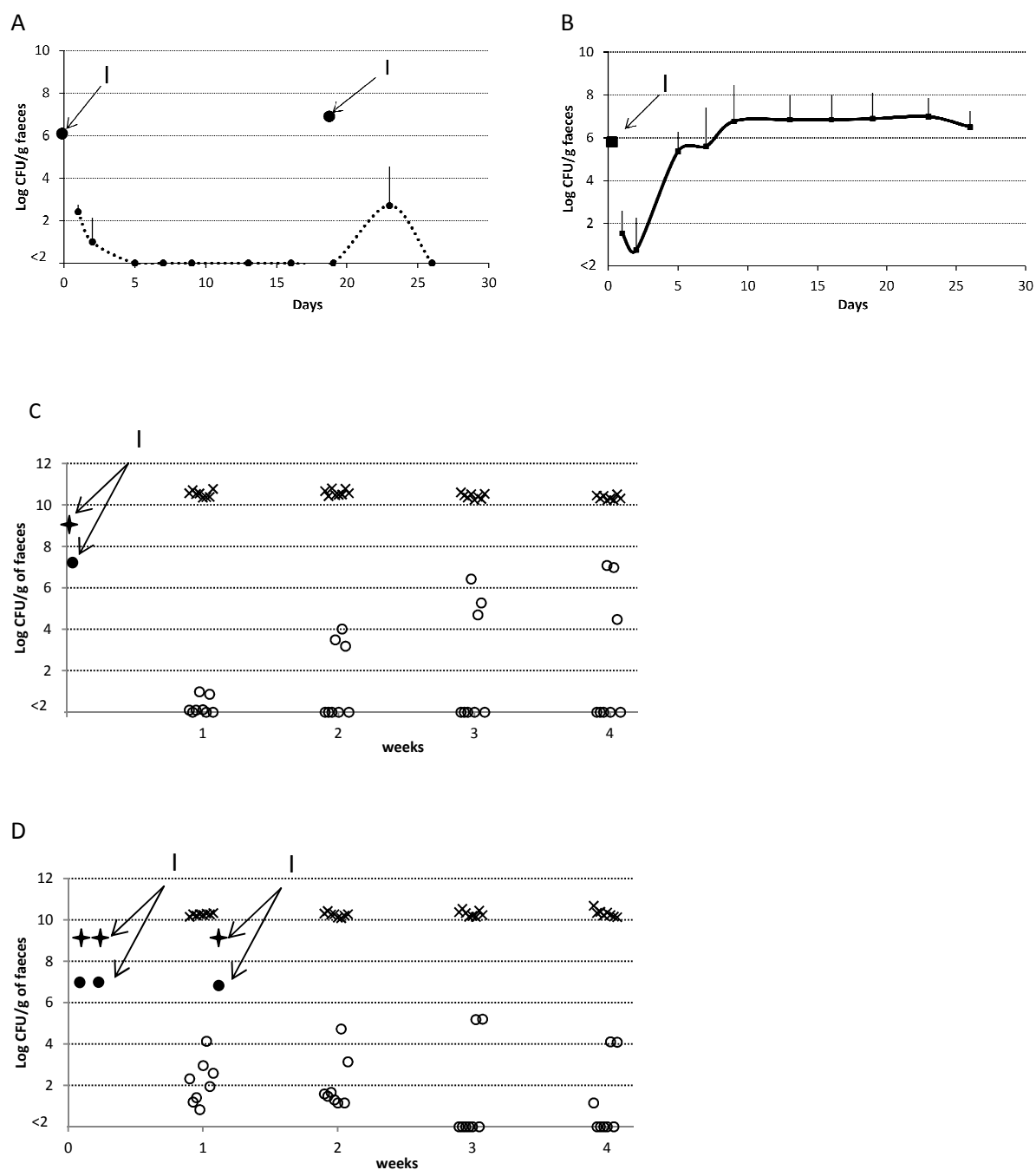


Figure 2: Numeration of yogurt bacteria in GIT

(A) Numeration of *L. bulgaricus* ATCC 11842 in faeces of mono-associated rats (n=4). (I): inoculation repeated twice.

(B) Numeration of *L. bulgaricus* ATCC 11842 in faeces of mono-associated rats (n=4) receiving lactose (45g/L). (I): inoculation.

(C) Numeration of *S. thermophilus* LMD-9 (x) and *L. bulgaricus* ATCC 11842 (o) in faeces of di-associated rats receiving lactose (45g/L). (I): inoculation of *S. thermophilus* LMD-9 (✦) and *L. bulgaricus* ATCC 11842 (●).

(D) Numeration of *S. thermophilus* LMD-9 (filled symbols) and *L. bulgaricus* ATCC 11842 (empty symbols) in faeces of di-associated rats receiving lactose (45g/L). (I): three inoculations (days 1, 2 and 8) of *S. thermophilus* LMD-9 (✚) and *L. bulgaricus* ATCC 11842 (●).

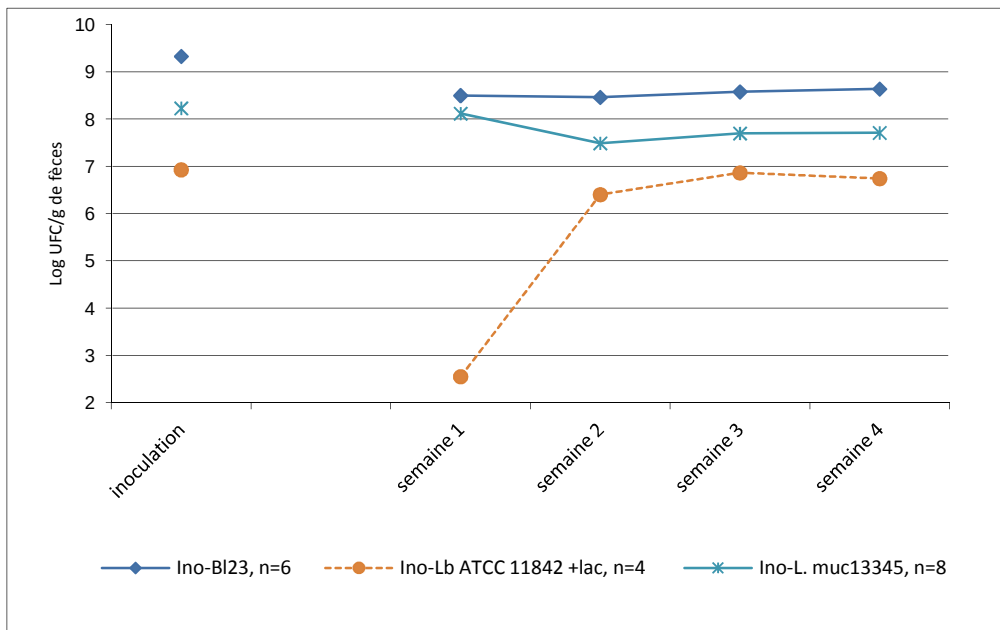


Figure 31 : Colonisation du tractus digestif de rats axéniques avec différentes bactéries lactiques sans et avec de 45 g/L apport de lactose

(Ino-BI23 : *L. casei*, Ino-L. muc 13345 : *L. mucosae* DSM 13345; Ino-Lb ATCC 11842 +lac : *L. bulgaricus* ATCC 11842 avec apport de lactose à 45g/l dans l'eau de boisson)

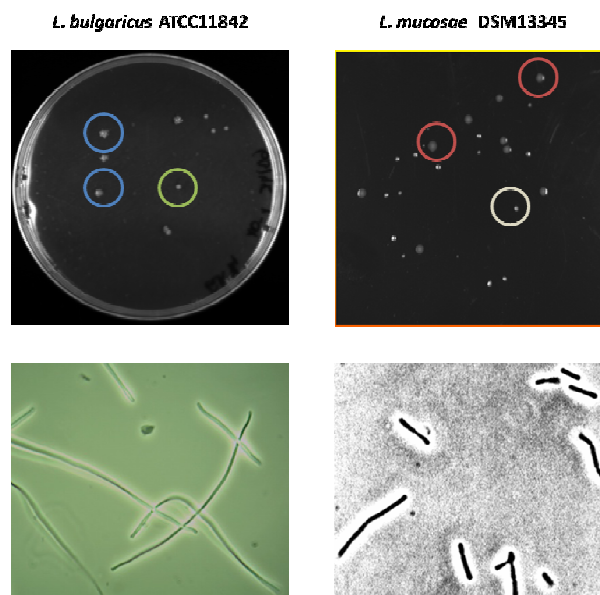


Figure 32: Photographies et observations microscopiques de colonies de *L. bulgaricus* et de *L. mucosae* après passage dans le TD

3 Résultats complémentaires

Polymorphisme des bactéries lactiques après passage dans le TD

Nous avons choisi dans la suite de ce travail de comparer la colonisation du TD par l'une des bactéries du yaourt : *L. bulgaricus* et deux autres bactéries lactiques; la souche probiotique *Lactobacillus casei* BL23 (*L. casei*) (données disponibles au laboratoire) et *Lactobacillus mucosae* DSM 13345 (*L. mucosae*). *L. mucosae* est détecté dans les fèces de patients atteints du syndrome du grêle court (anastomose jéuno-colique) alors que cette bactérie n'est pas détectable chez les contrôles. *L. mucosae* représente 0,4 à 12% de toutes les bactéries d'origine fécale chez les patients (Joly *et al.*, 2010). Nous avons suivi la colonisation du tractus digestif de rats axéniques par certaines bactéries lactiques.

3.1 Résultats

La colonisation du TD de rats axéniques par différentes bactéries lactiques est représentée dans la Figure 31. *L. casei* et *L. mucosae* ne présentent pas de phase d'adaptation en absence d'apport de source de carbone exogène. Ces deux bactéries s'implantent et atteignent rapidement un niveau stable de colonisation dans le tractus digestif ($5 \cdot 10^8$ UFC/g de fèces et $6.4 \cdot 10^7$ UFC/g de fèces, respectivement).

L. bulgaricus ne colonise pas le TD en absence de source de carbone exogène. Un apport de lactose est indispensable à son implantation (*cf* ci-dessus). Une phase d'adaptation est nécessaire avant d'atteindre un niveau d'implantation de $1 \cdot 10^7$ UFC/g de fèces. Malgré les différentes cinétiques de colonisation et les niveaux de populations bactériennes dans le TD, un aspect de l'adaptation de *L. mucosae* et de *L. bulgaricus* a attiré notre attention. Ces deux bactéries présentent des morphologies différentes, au niveau des cellules et au niveau des colonies, après passage dans le TD (Figure 32).

L. bulgaricus présente des colonies de petite taille et des colonies de taille plus grande. *L. mucosae* présente des colonies blanches de petite taille et des colonies opaques à bord dentelé de taille plus grande. L'observation microscopique (x1000) de ces différentes colonies montre des bacilles de taille et de forme atypique (Figure 32). Lors du passage dans le TD, les cellules présentent une forme filamenteuse avec absence de septum.

3.2 Discussion

Les deux bactéries lactiques *L. bulgaricus* et *L. mucosae* présentent des modifications morphologiques au niveau des colonies et des cellules après passage dans le tractus digestif. Une réponse commune au stress est un changement dans la morphologie des cellules, en particulier la filamentation. La croissance des cellules se poursuit (en particulier l'élongation), mais le cloisonnement est inhibé. La filamentation se produit en réponse à la dessiccation, à la salinité élevée, aux températures et pH extrêmes et aux solvants organiques chez *Salmonella* (Mattick *et al.*, 2000; Mellefont *et al.*, 2005), chez *Bacillus* (Den Besten *et al.*, 2007) et chez *Lactobacillus* (Ingham *et al.*, 2008). Des hétérogénéités ont été observées *in vitro* suite à une croissance à un pH bas (passage de pH=5 à pH=3) chez *Lactobacillus plantarum* WCFS1 ; les cellules bactériennes présentent alors un aspect filamenteux (Ingham *et al.*, 2008).

Les modifications morphologiques suite à l'adaptation aux conditions dans le TD sont peu décrites dans la littérature aussi bien pour des espèces commensales que pour des espèces provenant d'écosystèmes alimentaires. *Lactobacillus sakei* 23K qui a colonisé le TD de souris axéniques à 10^9 UFC/g de fèces montre des changements morphologiques après passage dans le TD (Chiaramonte *et al.*, 2009). Ces changements se manifestent par l'apparition de deux nouveaux types de colonies : des colonies petites et des colonies rugueuses. Des modifications ont été aussi observées au niveau des cellules bactériennes. Les bactéries issues des colonies petites et rugueuses présentent des cellules plus longues que ceux de la souche sauvage ainsi que des cellules à aspect filamenteux. Dans certains cas, un mix de ces deux aspects-là et des cellules courtes (aspect de la souche sauvage) apparaissent en même temps.

Des morphotypes différents apparaissent aussi bien au niveau des colonies qu'au niveau des cellules chez *Escherichia coli* (*E. coli*) après passage dans le TD de souris axéniques. Des bactéries présentant une motilité réduite apparaissent dans les fèces de toutes les souris gnotobiotiques colonisées avec *E. coli*. Les colonies ont affiché un nouveau morphotype « colonies petites et granulaires » distinct du morphotype « colonies grandes et lisses » de la souche inoculée. Les colonies petites et granulaires obtenues ne sont pas détectées dans les inocula initiaux. Elles apparaissent dans les fèces deux jours après l'inoculation et ont atteint un taux de 90% dans les sept jours. Leur phénotype reste stable lorsqu'elles sont cultivées *in vitro* sur de nombreuses générations, indiquant que la mutation

résultant du passage dans le TD est héréditaire et peut résulter de la rapide sélection *in vivo*. Les changements morphologiques observés pourraient être expliqués par les conditions de stress subies par la bactérie lors du passage dans le TD.

3.3 Discussion générale

Ce travail nous a permis de mieux connaître l'évolution des deux bactéries du yaourt dans le TD de rats gnotobiotiques ainsi que leur survie. L'avantage numérique de *S. thermophilus* sur *L. bulgaricus* observé en co-culture *in vitro* se maintient *in vivo* dans nos conditions. En effet, *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* colonisent le TD de rats axéniques respectivement à des valeurs maximales de 10^{10} UFC/g de fèces et 10^7 UFC/g de fèces en présence de lactose (45g/L). La colonisation est hétérogène entre les différents rats.

Qu'est ce qui régit la relation entre *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* dans le TD ? Et quel est le type d'interactions qui y intervient?

Le premier point à soulever est la disponibilité des nutriments dans le TD. Mise à part la capacité de *S. thermophilus* à bio-synthétiser des nutriments azotés et à métaboliser certains polymères de glucose, en particulier en présence de lactose, une compétition peut s'établir pour des substrats assimilables par les deux bactéries à savoir le lactose. Le lactose est indispensable à la colonisation du TD par *L. bulgaricus* et il confère un avantage de colonisation à *S. thermophilus* (Chapitre 2 : (Thomas *et al.*, 2011). *In vitro*, nous avons observé l'avantage de *S. thermophilus* sur *L. bulgaricus* en co-culture et en particulier dans le lait dont la source principale de carbone est le lactose. L'inhibition par compétition pour le lactose a été observée par Moon et Reinbold (1976) dans le cas de l'association de *S. thermophilus* et *L. bulgaricus*. Une compétition peut probablement s'établir entre les deux bactéries vis-à-vis de ce substrat dans le TD. L'assimilation rapide du lactose par *S. thermophilus* pourrait être un facteur limitant pour la colonisation du TD par *L. bulgaricus*.

Le deuxième point, relie à la fois les conditions dans le TD et les métabolites produits par les deux bactéries dans le TD. Nous avons observé qu'*in vivo*, *S. thermophilus* LMD-9 est métaboliquement actif dans le TD (Chapitre 1 : (Rul *et al.*, 2011), et que l'apport de lactose stimule son activité glycolytique (Chapitre 2 : (Thomas *et al.*, 2011). Cette activité conduit à une production exclusive de L-lactate dans le TD des rats, autour de 30 mM quand *S. thermophilus* est associé à *L. bulgaricus* et autour de 40 mM dans le TD des rats chez qui *L. bulgaricus* est au-dessous du seuil de détection. Cette valeur concorde avec la concentration de lactate produite en fermenteur à laquelle il y a un premier arrêt de la croissance de *L.*

bulgaricus (Mercade *et al.*, 2003). Ainsi, la production de L-lactate par *S. thermophilus* peut être un facteur inhibant la colonisation du TD par *L. bulgaricus*.

L'inhibition de *L. bulgaricus* par le lactate et ce, à pH constant (autour de 6.4 ce qui est très proche du pH caecal qui est de 6.3) est régie par deux facteurs : la concentration totale de lactate et le rapport D / L des stéréo-isomères d'acide lactique (Benthin & Villadsen, 1995). Le L-lactate est plus inhibiteur que le D-lactate. L'effet inhibiteur se traduit par une phase de latence extrêmement prolongée (2 à 39 heures pour une concentration 0 à 25 g/L d'acide lactique) *in vitro*. Une culture hétérogène est obtenue car une partie de la culture est incapable de se développer en présence de L-lactate.

Ces deux facteurs pourraient inhiber la croissance de *L. bulgaricus* dans le TD : la compétition pour le lactose et la production de L-lactate par *S. thermophilus*. Ils expliqueraient la baisse de colonisation de *L. bulgaricus* observée suite aux trois inoculations successives administrés aux rats. Suite à la multiplication des gavages réalisés dans le but d'augmenter la population de *L. bulgaricus* dans le TD, l'effet inverse a peut-être été obtenu, en apportant un compétiteur pour le substrat et un inhibiteur par la production de L-lactate.

Les conditions dans le TD des rats axéniques présentent aussi un désavantage pour la colonisation de *L. bulgaricus* qui est la présence d'oxygène. En effet, l'analyse du génome de *L. bulgaricus* ATCC11842 révèle que les principales enzymes de détoxification de l'oxygène et de ses dérivés toxiques (enzymes de type peroxydase, superoxide dismutase, catalase ou NADH oxydase) sont absentes (Van De Guchte *et al.*, 2006). En conditions de micro-aérobie, *L. bulgaricus* produit de l' H_2O_2 qui contribue à l'arrêt de sa croissance (Van De Guchte *et al.*, 2001). En effet, une pyruvate oxydase (Pox1) est présente dans le génome de *L. bulgaricus* ATCC11842. Cette enzyme produit de l'acétyl-P à partir du pyruvate en présence d'oxygène, résultant en une production de H_2O_2 . Il a été démontré que cette souche produit du H_2O_2 à pH6.5, pH proche de celui du contenu caecal en présence de glucose et d'oxygène (Marty-Teyssset *et al.*, 2000). De son côté, *S. thermophilus* possède une « H_2O -forming NADH oxydase», codée par *nox2* (Bolotin *et al.*, 2004), qui catalyse la réduction de l'oxygène en eau. Une superoxide dismutase à manganèse, codée par *sodA*, dont l'activité n'est pas régulée par l'oxygène (Chang & Hassan, 1997), convertit les anions superoxydes en oxygène moléculaire et en peroxyde d'hydrogène. Dans le TD, *S. thermophilus* induit (2.4 fois plus par

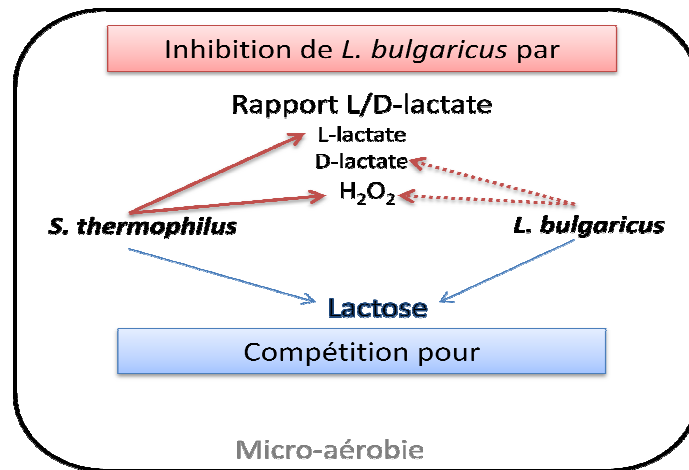


Figure 33: Interactions proposées entre *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* dans le TD de rats gnotobiotiques

rapport à une croissance en lait) la superoxide dismutase à manganèse (SodA) (Rul *et al.*, 2011) qui convertit donc les anions superoxydes en oxygène moléculaire et en H₂O₂.

Ainsi, l'accumulation de ces facteurs pourrait être la cause du désavantage de *L. bulgaricus* dans le TD. Deux interactions pourraient régir les relations entre *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* à savoir la compétition pour le lactose et l'antagonisme par la production de lactate et de H₂O₂ comme présenté dans la Figure 33.

Conclusions et perspectives

Ce travail nous a permis de mieux connaître l'adaptation de *S. thermophilus* au tractus digestif et son impact sur l'hôte. Nous avons caractérisé le métabolisme de cette bactérie dans le TD de rats gnotobiotiques ce qui nous a permis en premier lieu de constater qu'elle est métaboliquement active *in vivo* et en deuxième lieu de mettre en évidence l'intensification de son métabolisme glycolytique. Ce travail a apporté également une meilleure connaissance de l'effet de l'introduction d'une source de carbone directement assimilable par *S. thermophilus* sur le niveau de la colonisation de l'hôte, l'adaptation au TD et son activité métabolique. Nous avons aussi montré que le lactose est un facteur limitant de la colonisation du TD et que l'activation des enzymes impliquées dans le métabolisme des sucres constitue la signature de *S. thermophilus* dans le TD. Cette étude a aussi permis de caractériser la relation et l'activité des deux bactéries du yaourt dans des modèles simplifiés aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* ainsi que d'observer l'avantage numérique de *S. thermophilus* sur *L. bulgaricus* en co-culture *in vitro*. Cet avantage semble se maintenir dans le TD de rats gnotobiotiques.

Côté hôte, la production de L-lactate par *S. thermophilus* dans la lumière intestinale induit les transporteurs de mono-carboxylates et la protéine d'arrêt du cycle cellulaire p27^{kip1} avec des niveaux d'induction similaires entre les deux lots de rats Ino-LMD9^{+lac} et Ino-LMD9. Cela indique vraisemblablement une homéostasie au niveau du TD et montre que le lactate est probablement une molécule « signal » qui induit la réponse de l'hôte.

L'utilisation des rats initialement axéniques pour l'étude de la physiologie de *S. thermophilus* dans le TD et l'impact de son arrivée sur l'hôte est la stratégie que nous avons choisie. Les conclusions de ce travail doivent être replacées dans le modèle d'étude choisi à savoir les rats gnotobiotiques qui présentent des caractéristiques morphologiques qui les distinguent des animaux conventionnels. En ayant conscience des limites de notre stratégie, l'intérêt d'utiliser un modèle animal axénique est qu'il fournit plus d'informations sur l'adaptation d'une bactérie au TD et permet de se focaliser sur ses effets spécifiques sur l'hôte. Un modèle animal axénique ou gnotobiotique permet également l'utilisation de souches mutantes afin d'évaluer le rôle et l'importance de certains gènes. Les rongeurs servent le plus souvent de modèle d'étude en raison de leur petite taille, leur reproduction

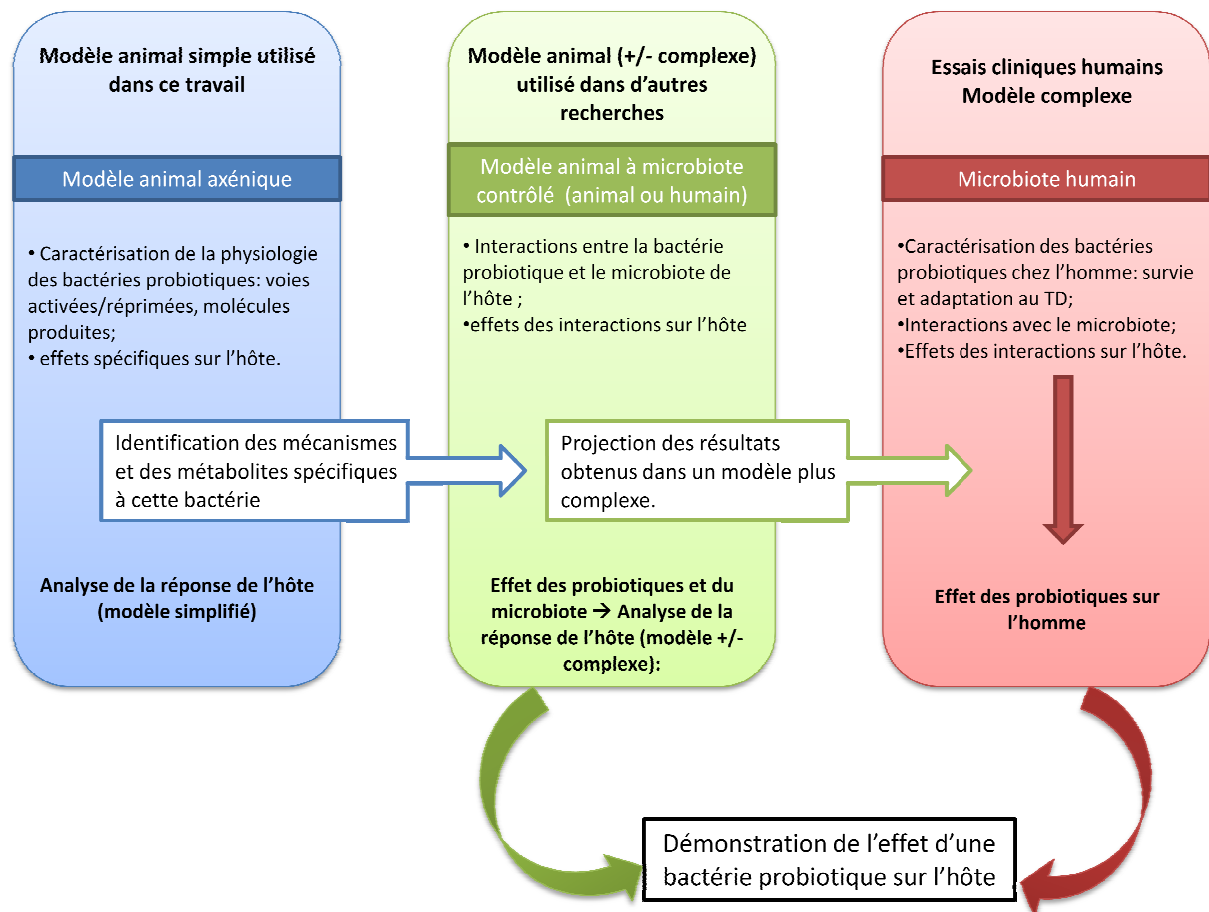


Figure 34 : Présentation de différents modèles d'étude et leur complémentarité dans le conduite des analyses des effets des bactéries probiotiques sur l'hôte

relativement rapide, les connaissances génétiques bien définies chez ces animaux et la disponibilité des outils d'étude. Dans notre travail, le recours à un modèle de rongeurs porteurs d'une seule bactérie nous a permis de décortiquer les modifications physiologiques de *S. thermophilus* et d'identifier les métabolites spécifiques produit par *S. thermophilus* dans le TD sans aucune interaction avec d'autres bactéries productrices ou utilisatrices de lactate. La disponibilité de divers outils nous a permis d'étudier la réponse de l'hôte suite à la production de lactate et cela au niveau des transporteurs de carboxylates et au niveau de l'épithélium colique. Dans la mesure où nous avons observé l'augmentation de l'activité glycolytique de *S. thermophilus* dans le TD de rats gnotobiotiques, il est important de rappeler que du côté hôte, le rat présente 83% de similitude au niveau de l'activité de la lactase intestinale que l'homme (Oku *et al.*, 2011). Ainsi, même si le modèle animal axénique utilisé n'est pas le reflet exact de l'impact de la consommation des bactéries probiotiques et particulièrement *S. thermophilus* par l'Homme, il en permet une meilleure connaissance et facilite le déroulement de l'étude. Un modèle animal axénique simple permet d'étudier la physiologie d'une bactérie ainsi que son adaptation au TD en examinant les voies activées/réprimées et les métabolites produits. Il permet surtout d'intégrer les résultats observés dans un modèle plus complexe (Figure 34). Les résultats des études dans un modèle simplifié permettent de mieux comprendre les mécanismes observés et d'identifier les molécules produites afin de les reconnaître spécifiquement dans un modèle plus complexe. De même, ce qui est observé dans un modèle animal complexe oriente les analyses des effets observés chez l'homme.

Dans le but de situer notre travail par rapport à ceux portant sur l'étude des produits probiotiques incluant entre autre *S. thermophilus* (adaptation et survie des bactéries lactiques/effets sur l'hôte), deux études effectuées sur des modèles de rongeurs présentant un microbiote de souris ou humain et un modèle présentant une pathologie donnent d'autres ouvertures à notre travail.

Dans un modèle de souris saines à microbiote façonné (souris ou homme), le microbiote reste stable suite à la consommation de lait fermenté. Néanmoins, des changements notables au niveau du métabolisme du carbone ont été observés. Ils se traduisant par une augmentation particulièrement importante du métabolisme du carbone (McNulty *et al.*, 2011). Dans la seconde étude utilisant des souris présentant une colite ulcéreuse, Veiga et ses collaborateurs ont montré que la consommation d'un produit laitier

fermenté provoque une diminution du pH dans le caecum, des changements au niveau des profils des acides gras à chaînes courtes et en parallèle des augmentations des bactéries consommatrices de lactate et productrices de butyrate. Ces modifications créent ainsi un environnement non permissif au développement d'*Enterobacteriaceae* et plus résistant au développement de pathogènes (Veiga *et al.*, 2010). La capacité de moduler la composition du microbiote intestinal par des laits fermentés chez les souris atteintes de colite pourrait impliquer que leur microbiote est instable.

La principale observation suite à l'adaptation de *S. thermophilus* au TD est l'augmentation de la glycolyse et la production de L-lactate en quantité plus importante en présence de lactose. Nous avons aussi montré dans notre travail, que dans un modèle animal gnotobiotique *L. bulgaricus* est métaboliquement actif même s'il n'est pas détecté et produit du D-lactate dans le TD. Le problème qui se pose dans ce cas est lié à la toxicité du D-lactate. Ce métabolite est produit par des espèces de lactobacilles et peut présenter un risque dans le cas de certaines pathologies (Petersen, 2005). Une consommation quotidienne de yaourt contenant *L. bulgaricus* métaboliquement actif est-elle un risque? Dans le cas de patients ayant subi des chirurgies gastro-intestinales, des cas d'acidoses D-lactiques ont été rapportés (Hove & Mortensen, 1995; Petersen, 2005; Uribarri *et al.*, 1998). Chez l'hôte sain, le lactate est absorbé et n'est détecté qu'à de faibles niveaux (Duncan *et al.*, 2004). Plusieurs études rapportent l'effet du lactate sur les bactéries du microbiote. Le microbiote colique permet la dégradation en anaérobiose des sucres non absorbés au niveau de l'intestin. Il en résulte la production d'acides gras à chaînes courtes (AGCC), principalement l'acétate, le propionate et le butyrate, qui ont été reconnus pour leurs effets bénéfiques sur la santé (Topping & Clifton, 2001). Lors de la fermentation, le lactate est un intermédiaire-clé produit par les voies homofermentaires ou hétérofermentaires des bactéries. C'est un précurseur de la production de l'acétate du propionate et du butyrate dans des espèces telles que *Megasphaera* et *Veillonella*. Le lactate peut aussi être un co-substrat utilisé par des espèces réductrices de sulfate comme *Desulfovibrio piger* (Marquet *et al.*, 2009). Les bactéries utilisant le lactate sont importantes dans la mesure où elles participent à la prévention de l'accumulation de lactate dans le gros intestin. Des concentrations élevées de lactate ont été associées avec le syndrome du grêle court (Kaneko *et al.*, 1997), la colite ulcéreuse (Hove *et al.*, 1994; Vernia *et al.*, 1988), et peuvent conduire à

une neurotoxicité et une arythmie cardiaque (Chan *et al.*, 1994). Le lactate a été identifié en tant que précurseur important de la production de butyrate dans des échantillons fécaux (Belenguer *et al.*, 2007; Bourriaud *et al.*, 2005; Morrison *et al.*, 2006). Par ailleurs, *in vivo* chez les rongeurs, l'importance de l'utilisation du lactate pour la production de composés bénéfiques tels que le butyrate a été confirmée (Sato *et al.*, 2008). Le butyrate joue un rôle important dans l'homéostasie du tractus gastro-intestinal. Il agit sur les récepteurs intestinaux qui modulent la motilité intestinale et la réponse inflammatoire (Brown *et al.*, 2003; Tazoe *et al.*, 2008). Ainsi le lactate à la fois apporté par le yaourt et produit par les bactéries dans le TD est un précurseur d'autres composés qui ont un impact sur l'hôte.

Des études rapportent les effets du lactose ingéré lors de la consommation du yaourt sur la stimulation de la fermentation des bactéries fécales et montrent son rôle dans l'intensification de la modulation du microbiote. *In vitro*, l'incubation de bactéries fécales avec du lactose entraîne la baisse du pH (Uribe-Esquivel *et al.*, 1997) et une augmentation de la production d'AGCC (Lifschitz *et al.*, 1990). L'apport de lactose semble stimuler la fermentation des bactéries du microbiote. Une autre étude rapporte les effets du lactose sur la stimulation de l'activité des deux enzymes : β -glucosidase et β -galactosidase (Maisonneuve *et al.*, 2002). Il est proposé que leurs activités enzymatiques influencent le transfert de plasmide et la persistance des transconjugants dans le tube digestif des souris associées avec une microflore fécale humaine. Cette activité est d'autant plus stimulée dans le cas d'apport d'une solution de lactose par rapport à un yaourt, un yaourt thermisé ou du lait. Cela peut jouer un rôle important dans la diminution de la résistance aux antibiotiques.

Ainsi, les effets bénéfiques du yaourt ne s'arrêtent pas à sa composition nutritionnelle riche à la fois en calcium, oligo-nutriments et protéines. Les allégations santé attribuées par l'EFSA en 2010 accentuent encore plus ses effets probiotiques grâce à l'action de ses ferments dans l'amélioration de la digestion du lactose. D'autre part, l'ingestion quotidienne de nutriments et de bactéries vivantes par l'hôte est un facteur qui peut clairement moduler le microbiote intestinal. Les bactéries du yaourt pourraient induire d'autres modifications à explorer au niveau de l'hôte. Il serait intéressant d'étudier ces possibles effets en utilisant un modèle plus complexe (avec des bactéries utilisatrices de lactate). Dans notre étude, nous avons montré l'effet de *S. thermophilus* sur l'hôte et

particulièrement dans la modulation du cycle cellulaire. Il serait donc intéressant d'étudier les effets de cette bactérie dans le cas de certaines pathologies inflammatoires digestives.

Références bibliographiques

(1975). Codex Standard for Yoghurt (Yogurt) and Sweetened Yoghurt (Yogurt). In *ALINORM 03/11*, para 61-62. Edited by C. S. f. F. Milks.

(1988). Décret n°88-1203 du 30 décembre 1988 relatif aux laits fermentés et au yaourt ou yoghurt In *NOR: ECOC8800150D*.

Acuña, G., Latrille, E., Béal, C., Corrieu, G. & Chéruey, A. (1994). On-line estimation of biological variables during pH controlled lactic acid fermentations. *Biotechnology and Bioengineering* **44**, 1168-1176.

Ajdic, D., McShan, W. M., McLaughlin, R. E. & other authors (2002). Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 14434-14439.

Aldinucci, C., Bellussi, L., Monciatti, G., Passàli, G. C., Salerni, L., Passàli, D. & Bocci, V. (2002). Effects of dietary yoghurt on immunological and clinical parameters of rhinopathic patients. *European Journal of Clinical Nutrition* **56**, 1155-1161.

Alpert, C., Scheel, J., Engst, W., Loh, G. & Blaut, M. (2009). Adaptation of protein expression by *Escherichia coli* in the gastrointestinal tract of gnotobiotic mice. *Environmental Microbiology* **11**, 751-761.

An, H., Zhai, Z., Yin, S., Luo, Y., Han, B. & Hao, Y. (2011). Coexpression of the Superoxide Dismutase and the Catalase Provides Remarkable Oxidative Stress Resistance in *Lactobacillus rhamnosus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**, 3851-3856.

Andrus, J. M., Bowen, S. W., Klaenhammer, T. R. & Hassan, H. M. (2003). Molecular characterization and functional analysis of the manganese-containing superoxide dismutase gene (*sodA*) from *Streptococcus thermophilus* AO54. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **420**, 103-113.

Anses (2008). Composition nutritionnelle des aliments TABLE CIQUAL.

Arena, S., D'Ambrosio, C., Renzone, G. & other authors (2006). A study of *Streptococcus thermophilus* proteome by integrated analytical procedures and differential expression investigations. *PROTEOMICS* **6**, 181-192.

Beal, C. & Corrieu, G. (1991). Influence of pH, temperature, and inoculum composition on mixed cultures of *Streptococcus thermophilus* 404 and *Lactobacillus bulgaricus* 398. *Biotechnology and Bioengineering* **38**, 90-98.

Beal, C., Spinnler, H. E. & Corrieu, G. (1994). Comparaison of growth, acidification and productivity of pure and mixed cultures of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* 404 and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 398. *Appl Microbiol Biotechnol* **41**, 95-98.

Belenguer, A., Duncan, S. H., Holtrop, G., Anderson, S. E., Lobley, G. E. & Flint, H. J. (2007). Impact of pH on Lactate Formation and Utilization by Human Fecal Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 6526-6533.

Benthin, S. & Villadsen, J. (1995). Different inhibition of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* by D- and L-lactic acid: effects on lag phase, growth rate and cell yield. *Journal of Applied Microbiology* **78**, 647-654.

Besson, A., Dowdy, S. F. & Roberts, J. M. (2008). CDK Inhibitors: Cell Cycle Regulators and Beyond. *Developmental cell* **14**, 159-169.

Biswas, I., Gruss, A., Ehrlich, S. D. & Maguin, E. (1993). High-efficiency gene inactivation and replacement system for gram-positive bacteria. *Journal of Bacteriology* **175**, 3628-3635.

Bolotin, A., Quinquis, B., Renault, P. & other authors (2004). Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Nat Biotechnol* **22**, 1554-1558.

Boudraa, G., Benbouabdellah, M., Hachelaf, W., Boisset, M., Desjeux, J.-F. & Touhami, M. (2001). Effect of Feeding Yogurt Versus Milk in Children With Acute Diarrhea and Carbohydrate Malabsorption. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition* **33**, 307-313.

Bourlioux, P., Braesco, V. & Mater, D. D. G. (2011). Yaourts et autres laits fermentés. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*.

Bourriaud, C., Robins, R. J., Martin, L., Kozlowski, F., Tenailleau, E., Cherbut, C. & Michel, C. (2005). Lactate is mainly fermented to butyrate by human intestinal microfloras but inter-individual variation is evident. *Journal of Applied Microbiology* **99**, 201-212.

Bron, P. A., Grangette, C., Mercenier, A., de Vos, W. M. & Kleerebezem, M. (2004). Identification of *Lactobacillus plantarum* Genes That Are Induced in the Gastrointestinal Tract of Mice. *Journal of Bacteriology* **186**, 5721-5729.

Bronner, F. & Pansu, D. (1999). Nutritional Aspects of Calcium Absorption. *The Journal of Nutrition* **129**, 9-12.

Brown, A. J., Goldsworthy, S. M., Barnes, A. A. & other authors (2003). The Orphan G Protein-coupled Receptors GPR41 and GPR43 Are Activated by Propionate and Other Short Chain Carboxylic Acids. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 11312-11319.

Bruhn, J. C. & Collins, E. B. (1970). Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotise Oxidase of *Streptococcus diacetilactis*. *Journal of Dairy Science* **53**, 857-860.

Bruno-Barcena, J. M., Azcrate-Peril, M. A. & Hassan, H. M. Role of Antioxidant Enzymes in Bacterial Resistance to Organic Acids. *Applied and Environmental Microbiology* **76**, 2747-2753.

Canzi, E., Casiraghi, M. C., Zanchi, R. & other authors (2002). Yogurt in the diet of the elderly: a preliminary investigation into its effect on the gut ecosystem and lipid metabolism. *Lait* **82**, 713-723.

Chan, L., Slater, J., Hasbargen, J., Herndon, D., Veech, R. & Wolf, S. (1994). Neurocardiac toxicity of racemic D,L-lactate fluids. *Integr Physiol Behav Sci* **29**, 383-394.

Chang, D.-E., Smalley, D. J., Tucker, D. L. & other authors (2004). Carbon nutrition of *Escherichia coli* in the mouse intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 7427-7432.

Chang, S. K. & Hassan, H. M. (1997). Characterization of superoxide dismutase in *Streptococcus thermophilus*. *Appl Environ Microbiol* **63**, 3732-3735.

Chapelot, D. & Payen, F. (2010). Comparison of the effects of a liquid yogurt and chocolate bars on satiety: a multidimensional approach. *British Journal of Nutrition* **103**, 760-767.

Chaves, S., Perdigon, G. & de Moreno de LeBlanc, A. (2011). Yoghurt Consumption Regulates the Immune Cells Implicated in Acute Intestinal Inflammation and Prevents the Recurrence of the Inflammatory Process in a Mouse Model. *Journal of Food Protection* **74**, 801-811.

Cherbuy, C., Honvo-Houeto, E., Bruneau, A., Bridonneau, C., Mayeur, C., Duée, P.-H., Langella, P. & Thomas, M. (2010). Microbiota matures colonic epithelium through a coordinated induction of cell cycle-related proteins in gnotobiotic rat. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* **299**, G348-G357.

Chiaramonte, F., Blugeon, S. b., Chaillou, S. p., Langella, P. & Zagorec, M. (2009). Behavior of the Meat-Borne Bacterium *Lactobacillus sakei* during Its Transit through the Gastrointestinal Tracts of Axenic and Conventional Mice. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 4498-4505.

Chiaramonte, F., Anglade, P., Baraige, F., Gratadoux, J.-J., Langella, P., Champomier-Vergès, M.-C. & Zagorec, M. (2010). Analysis of *Lactobacillus sakei* Mutants Selected after Adaptation to the Gastrointestinal Tracts of Axenic Mice. *Applied and Environmental Microbiology* **76**, 2932-2939.

Cochu, A., Vadeboncoeur, C., Moineau, S. & Frenette, M. (2003). Genetic and Biochemical Characterization of the Phosphoenolpyruvate:Glucose/Mannose Phosphotransferase System of *Streptococcus thermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 5423-5432.

Coudeyras, S. & Forestier, C. (2010). Microbiote et probiotiques : impact en santé humaine. *Canadian Journal of Microbiology* **56**, 611-650.

Courtin, P., Monnet, V. & Rul, F. (2002). Cell-wall proteinases PrtS and PrtB have a different role in *Streptococcus thermophilus*/*Lactobacillus bulgaricus* mixed cultures in milk. *Microbiology* **148**, 3413-3421.

Courtin, P. & Rul, F. (2004). Interactions between microorganisms in a simple ecosystem: yogurt bacteria as a study model. *Lait* **84**, 125-134.

CREDOC/CNIEL (2010). Le baromètre Cniel de la consommation des produits laitiers: Cniel-infos - Les actions du Cniel au service de la filière laitière.

Crittenden, R. G., Martinez, N. R. & Playne, M. J. (2003). Synthesis and utilisation of folate by yoghurt starter cultures and probiotic bacteria. *International Journal of Food Microbiology* **80**, 217-222.

de Vos, W. M. & Hugenholtz, J. (2004). Engineering metabolic highways in Lactococci and other lactic acid bacteria. *Trends in Biotechnology* **22**, 72-79.

De Vuyst, L., Schrijvers, V., Paramithiotis, S., Hoste, B., Vancanneyt, M., Swings, J., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E. & Messens, W. (2002). The Biodiversity of Lactic Acid Bacteria in Greek Traditional Wheat Sourdoughs Is Reflected in Both Composition and Metabolite Formation. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 6059-6069.

Del Campo, R., Bravo, D., Cantón, R., Ruiz-Garbajosa, P., García-Albiach, R., Montesi-Libois, A., Yuste, F.-J., Abaira, V. & Baquero, F. (2005). Scarce Evidence of Yogurt Lactic Acid Bacteria in Human Feces after Daily Yogurt Consumption by Healthy Volunteers. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 547-549.

Delorme, C., Bartholini, C., Bolotine, A., Ehrlich, S. D. & Renault, P. (2009). Emergence of a Cell Wall Protease in the *Streptococcus thermophilus* Population. *Applied and Environmental Microbiology* **76**, 451-460.

Delorme, C., Bartholini, C., Luraschi, M. I., Pons, N., Loux, V., Almeida, M., Guédon, E., Gibrat, J.-F. & Renault, P. (2011). Complete Genome Sequence of the Pigmented *Streptococcus thermophilus* Strain JIM8232. *Journal of Bacteriology* **193**, 5581-5582.

Den Besten, H. M. W., Ingham, C. J., van Hylckama Vlieg, J. E. T., Beerthuyzen, M. M., Zwietering, M. H. & Abee, T. (2007). Quantitative Analysis of Population Heterogeneity of the Adaptive Salt Stress Response and Growth Capacity of *Bacillus cereus* ATCC 14579. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 4797-4804.

Derzelle, S., Bolotin, A., Mistou, M.-Y. & Rul, F. (2005). Proteome Analysis of *Streptococcus thermophilus* Grown in Milk Reveals Pyruvate Formate-Lyase as the Major Upregulated Protein. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 8597-8605.

Deutscher, J., Küster, E., Bergstedt, U., Charrier, V. & Hillen, W. (1995). Protein kinase-dependent HPr/CcpA interaction links glycolytic activity to carbon catabolite repression in Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology* **15**, 1049-1053.

Dewit, O., Pochart, P. & Desjeux, J. (1988). Breath hydrogen concentration and plasma glucose, insulin and free fatty acid levels after lactose, milk, fresh or heated yogurt ingestion by healthy young adults with or without lactose malabsorption. *Nutrition* **4**, 131-135.

DiGiulio, D. B., Romero, R., Amogan, H. P. & other authors (2008). Microbial Prevalence, Diversity and Abundance in Amniotic Fluid During Preterm Labor: A Molecular and Culture-Based Investigation. *PLoS One* **3**, e3056.

Driessen, F. M., Kingma, F., Stadhouders, J. & (1982). Evidence that *Lactobacillus bulgaricus* in yogurt is stimulated by carbon dioxide produced by *Streptococcus thermophilus*. *Neth Milk Dairy J* **36**, 135-144.

Drouault, S., Anba, J. & Corthier, G. (2002). *Streptococcus thermophilus* is able to produce a beta-galactosidase active during its transit in the digestive tract of germ-free mice. *Appl Environ Microbiol* **68**, 938-941.

Duncan, S. H., Louis, P. & Flint, H. J. (2004). Lactate-Utilizing Bacteria, Isolated from Human Feces, That Produce Butyrate as a Major Fermentation Product. *Appl Environ Microbiol* **70**, 5810-5817.

EFSA (2010). Scientific Opinion on lactose thresholds in lactose intolerance and galactosaemia. *EFSA Journal* **8(9):1777**, 29 pp.

Eng, C., Thibessard, A., Danielsen, M., Rasmussen, T., Mari, J.-F. & Leblond, P. (2011). In silico prediction of horizontal gene transfer in *Streptococcus thermophilus*. *Archives of Microbiology* **193**, 287-297.

Eren, M., Dinleyici, E. C. & Vandenplas, Y. (2010). Clinical Efficacy Comparison of *Saccharomyces boulardii* and Yogurt Fluid in Acute Non-Bloody Diarrhea in Children: A Randomized, Controlled, Open Label Study. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **82**, 488-491.

Facklam, R. (2002). What Happened to the Streptococci: Overview of Taxonomic and Nomenclature Changes. *Clinical Microbiology Reviews* **15**, 613-630.

Falk, P. G., Hooper, L. V., Midtvedt, T. & Gordon, J. I. (1998). Creating and Maintaining the Gastrointestinal Ecosystem: What We Know and Need To Know from Gnotobiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**, 1157-1170.

Fanaro, S., Chierici, R., Guerrini, P. & Vigi, V. (2003). Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr Suppl* **91**, 48-55.

Farrow, J. A. E. & Collins, M. D. (1984). DNA Base Composition, DNA-DNA Homology and Long-chain Fatty Acid Studies on *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*. *Journal of General Microbiology* **130**, 357-362.

Faye, T., Tamburello, A., Vegarud, G. E. & Skeie, S. (2011). Survival of lactic acid bacteria from fermented milks in an in vitro digestion model exploiting sequential incubation in human gastric and duodenum juice. *Journal of dairy science* **95**, 558-566.

Fernandez-Espla, M. a. D., Garault, P., Monnet, V. r. & Rul, F. o. (2000). *Streptococcus thermophilus* Cell Wall-Anchored Proteinase: Release, Purification, and Biochemical and Genetic Characterization. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 4772-4778.

Filho-Lima, J. V. M., Vieira, E. C. & Nicoli, J. R. (2000). Antagonistic effect of *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces boulardii* and *Escherichia coli* combinations against experimental infections with *Shigella flexneri* and *Salmonella enteritidis* subsp. typhimurium in gnotobiotic mice. *Journal of Applied Microbiology* **88**, 365-370.

Fontaine, L. & Hols, P. (2008). The Inhibitory Spectrum of Thermophilin 9 from *Streptococcus thermophilus* LMD-9 Depends on the Production of Multiple Peptides and the Activity of BlpGSt, a Thiol-Disulfide Oxidase. *Applied and Environmental Microbiology* **74**, 1102-1110.

Foucaud, C. & Poolman, B. (1992). Lactose transport system of *Streptococcus thermophilus*. Functional reconstitution of the protein and characterization of the kinetic mechanism of transport. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 22087-22094.

Galesloot, T. H. E. & Hassing, F. (1968). Stimulation of *Lactobacillus bulgaricus* by a factor produced by *Streptococcus thermophilus*. *Neth Milk Dairy J* **22**, 50-63.

Gardan, R., Besset, C., Guillot, A., Gitton, C. & Monnet, V. r. (2009). The Oligopeptide Transport System Is Essential for the Development of Natural Competence in *Streptococcus thermophilus* Strain LMD-9. *Journal of Bacteriology* **191**, 4647-4655.

Garvie, E. I. (1980). Bacterial lactate dehydrogenases. *Microbiol Rev* **44**, 106-139.

Gasson, M., J., Benson, K., Swindell, S. & Griffin, H. (1996). Metabolic engineering of the *Lactococcus lactis* diacetyl pathway. *Lait* **76**, 33-40.

Giraffa, G., Paris, A., Valcavi, L., Gatti, M. & Neviani, E. (2001). Genotypic and phenotypic heterogeneity of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy products. *Journal of Applied Microbiology* **91**, 937-943.

Glazunova, O. O., Raoult, D. & Roux, V. r. (2009). Partial sequence comparison of the *rpoB*, *sodA*, *groEL* and *gyrB* genes within the genus *Streptococcus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**, 2317-2322.

Glazunova, O. O., Raoult, D. & Roux, V. r. (2010). Partial *recN* gene sequencing: a new tool for identification and phylogeny within the genus *Streptococcus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**, 2140-2148.

Goh, Y., Goin, C., O'Flaherty, S., Altermann, E. & Hutkins, R. (2011). Specialized adaptation of a lactic acid bacterium to the milk environment: the comparative genomics of *Streptococcus thermophilus* LMD-9. *Microbial Cell Factories* **10**, S22.

Gueimonde, M., Sakata, S., Kalliomaki, M., Isolauri, E., Benno, Y. & Salminen, S. (2006). Effect of Maternal Consumption of *Lactobacillus GG* on Transfer and Establishment of Fecal Bifidobacterial Microbiota in Neonates. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition* **42**, 166-170.

Gunnewijk, M. G. W. & Poolman, B. (2000). Phosphorylation State of HPr Determines the Level of Expression and the Extent of Phosphorylation of the Lactose Transport Protein of *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 34073-34079.

Håvarstein, L. (2010). Increasing competence in the genus *Streptococcus*. *Mol Microbiol* **78**.

Herve-Jimenez, L., Guillouard, I., Guedon, E., Gautier, C., Boudebouze, S., Hols, P., Monnet, V., Rul, F. & Maguin, E. (2008). Physiology of *Streptococcus thermophilus* during the late stage of milk fermentation with special regard to sulfur amino-acid metabolism. *Proteomics* **8**, 4273-4286.

Herve-Jimenez, L., Guillouard, I., Guedon, E., Boudebouze, S., Hols, P., Monnet, V., Maguin, E. & Rul, F. (2009). Postgenomic analysis of *streptococcus thermophilus* cocultivated in milk with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: involvement of nitrogen, purine, and iron metabolism. *Appl Environ Microbiol* **75**, 2062-2073.

Hillman, J. D., Chen, A. & Snoep, J. L. (1996). Genetic and physiological analysis of the lethal effect of L-(+)-lactate dehydrogenase deficiency in *Streptococcus mutans*: complementation by alcohol dehydrogenase from *Zymomonas mobilis*. *Infection and Immunity* **64**, 4319-4323.

Hitchins, A., Wells, P., McDonough, F. & Wong, N. (1985). Amelioration of the adverse effect of a gastrointestinal challenge with *Salmonella enteritidis* on weanling rats by a yogurt diet. *The American Journal of Clinical Nutrition* **41**, 92-100.

Hols, P., Hancy, F., Fontaine, L. & other authors (2005). New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiol Rev* **29**, 435-463.

Hooper, L., Wong, M., Thelin, A., Hansson, L., Falk, P. & Gordon, J. (2001). Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* **291**, 881-884.

Hove, H., Nordgaard-Andersen, I. & Mortensen, P. (1994). Effect of lactic acid bacteria on the intestinal production of lactate and short-chain fatty acids, and the absorption of lactose. *The American Journal of Clinical Nutrition* **59**, 74-79.

Hove, H. & Mortensen, P. (1995). Colonic lactate metabolism and D-lactic acidosis. *Digestive diseases and sciences* **40**, 320-330.

Hueck, C. J., Kraus, A., Schmiedel, D. & Hillen, W. (1995). Cloning, expression and functional analyses of the catabolite control protein CcpA from *Bacillus megaterium*. *Molecular Microbiology* **16**, 855-864.

Hutkins, R., Morris, H. A. & McKay, L. L. (1985a). Galactokinase activity in *Streptococcus thermophilus*. *Appl Environ Microbiol* **50**, 777-780.

Hutkins, R., Morris, H. A. & McKay, L. L. (1985b). Galactose transport in *Streptococcus thermophilus*. *Appl Environ Microbiol* **50**, 772-776.

Hutkins, R. W. & Ponne, C. (1991). Lactose Uptake Driven by Galactose Efflux in *Streptococcus thermophilus*: Evidence for a Galactose-Lactose Antiporter. *Appl Environ Microbiol* **57**, 941-944.

INCA2 (2007). Etude individuelle Nationale sur les Consommations Alimentaires 2006-2007

Ingham, C. J., Beerthuyzen, M. & van Hylckama Vlieg, J. (2008). Population Heterogeneity of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 Microcolonies in Response to and Recovery from Acid Stress. *Applied and Environmental Microbiology* **74**, 7750-7758.

IPSOS/SYNDIFRAIS, E. (2008). Pouvoir d'achat et nutrition :Observatoire des perceptions et des comportements alimentaires des Français.

Ivanova, I., Miteva, V., Stefanova, T. & other authors (1998). Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* 81. *International Journal of Food Microbiology* **42**, 147-158.

Jiménez, E., Marin, M. L., Martin, R., Odriozola, J. M., Olivares, M., Xaus, J., Fernandez, L. & Rodriguez, J. M. (2008). Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Research in Microbiology* **159**, 187-193.

Joly, F., Mayeur, C., Bruneau, A. & other authors (2010). Drastic changes in fecal and mucosa-associated microbiota in adult patients with short bowel syndrome. *Biochimie* **92**, 753-761.

Juille, O., Bars, D. L. & Juillard, V. (2005). The specificity of oligopeptide transport by *Streptococcus thermophilus* resembles that of *Lactococcus lactis* and not that of pathogenic streptococci. *Microbiology* **151**, 1987-1994.

Kaneko, T., Bando, Y., Kurihara, H., Satomi, K., Nonoyama, K. & Matsuura, N. (1997). Fecal microflora in a patient with short-bowel syndrome and identification of dominant lactobacilli. *Journal of Clinical Microbiology* **35**, 3181-3185.

Kawamura, Y., Hou, X.-G., Sultana, F., Miura, H. & Ezaki, T. (1995). Determination of 16S rRNA Sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and Phylogenetic Relationships among Members of the Genus *Streptococcus*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **45**, 406-408.

Kimoto-Nira, H., Suzuki, C., Sasaki, K., Kobayashi, M. & Mizumachi, K. Survival of a *Lactococcus lactis* strain varies with its carbohydrate preference under in vitro conditions simulated gastrointestinal tract. *International Journal of Food Microbiology* **143**, 226-229.

Koenig, J. E., Spor, A., Scalfone, N., Fricker, A. D., Stombaugh, J., Knight, R., Angenent, L. T. & Ley, R. E. (2010). Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 4578-4585.

Kolars, J. C., Levitt, M. D., Aouji, M. & Savaiano, D. A. (1984). Yogurt An Autodigesting Source of Lactose. *New England Journal of Medicine* **310**, 1-3.

L'économie laitière en chiffres (2011). CNIEL.

Labayen, I., Forga, L., González, A., Lenoir-Wijnkoop, I., Nutr, R. & Martínez, J. A. (2001). Relationship between lactose digestion, gastrointestinal transit time and symptoms in lactose malabsorbers after dairy consumption. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* **15**, 543-549.

Lal, D., Verma, M. & Lal, R. (2011). Exploring internal features of 16S rRNA gene for identification of clinically relevant species of the genus *Streptococcus*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* **10**, 28.

Lancefield, R. C. (1933). A SEROLOGICAL DIFFERENTIATION OF HUMAN AND OTHER GROUPS OF HEMOLYTIC STREPTOCOCCI. *J Exp Med* **31**, 571-595.

LeBlanc, A. d. M. d. & Perdígón, G. (2004). Yogurt feeding inhibits promotion and progression of experimental colorectal cancer. *Med Sci Monit* **10**, 96-104

Lefebure, T. & Stanhope, M. (2007). Evolution of the core and pan-genome of *Streptococcus*: positive selection, recombination, and genome composition. *Genome Biology* **8**, R71.

Lerebours, E., N'Djitoyap Ndam, C., Lavoine, A., Hellot, M., Antoine, J. & Colin, R. (1989). Yogurt and fermented-then-pasteurized milk: effects of short-term and long-term ingestion on lactose absorption and mucosal lactase activity in lactase-deficient subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition* **49**, 823-827.

Letort, C. & Juillard, V. (2001). Development of a minimal chemically-defined medium for the exponential growth of *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Applied Microbiology* **91**, 1023-1029.

Letort, C., Nardi, M., Garault, P., Monnet, V. & Juillard, V. (2002). Casein utilization by *Streptococcus thermophilus* results in a diauxic growth in milk. *Appl Environ Microbiol* **68**, 3162-3165.

Lifschitz, C. H., Wolin, M. J. & Reeds, P. J. (1990). Characterization of Carbohydrate Fermentation in Feces of Formula-Fed and Breast-Fed Infants. *Pediatric Research* **27**, 166-169.

Liu, M., Siezen, R. J. & Nauta, A. (2009). In Silico Prediction of Horizontal Gene Transfer Events in *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* Reveals Protocooperation in Yogurt Manufacturing. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 4120-4129.

Liu, S.-Q. (2003). Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *International Journal of Food Microbiology* **83**, 115-131.

Lo Curto, A., Pitino, I., Mandalari, G., Dainty, J. R., Faulks, R. M. & John Wickham, M. S. (2011). Survival of probiotic lactobacilli in the upper gastrointestinal tract using an in vitro gastric model of digestion. *Food Microbiology* **28**, 1359-1366.

Luesink, E. J., Beumer, C. M. A., Kuipers, O. P. & De Vos, W. M. (1999). Molecular Characterization of the *Lactococcus lactis* ptsHI Operon and Analysis of the Regulatory Role of HPr. *Journal of Bacteriology* **181**, 764-771.

Mackie, R. I., Sghir, A. & Gaskins, H. R. (1999). Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *The American Journal of Clinical Nutrition* **69**, 1035S-1045S.

Maguin, E., Duwat, P., Hege, T., Ehrlich, D. & Gruss, A. (1992). New thermosensitive plasmid for gram-positive bacteria. *Journal of Bacteriology* **174**, 5633-5638.

Maisonneuve, S., Ouriet, M.-F. & Duval-Iflah, Y. (2002). Interrelationships between dairy product intake, microflora metabolism, faecal properties and plasmid dissemination in gnotobiotic mice. *British Journal of Nutrition* **87**, 121-129

Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y. & other authors (2006a). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 15611-15616.

Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y. & other authors (2006b). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 15611-15616.

Marco, M. L., Bongers, R. S., de Vos, W. M. & Kleerebezem, M. (2007). Spatial and Temporal Expression of *Lactobacillus plantarum* Genes in the Gastrointestinal Tracts of Mice. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 124-132.

Marco, M. L., Peters, T. H., Bongers, R. S., Molenaar, D., Van Hemert, S., Sonnenburg, J. L., Gordon, J. I. & Kleerebezem, M. (2009). Lifestyle of *Lactobacillus plantarum* in the mouse caecum. *Environ Microbiol* **11**, 2747-2757.

Marques, T. M., Wall, R., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Ryan, C. A. & Stanton, C. (2010). Programming infant gut microbiota: influence of dietary and environmental factors. *Current Opinion in Biotechnology* **21**, 149-156.

Marquet, P., Duncan, S. H., Chassard, C., Bernalier-Donadille, A. & Flint, H. J. (2009). Lactate has the potential to promote hydrogen sulphide formation in the human colon. *FEMS Microbiol Lett* **299**, 128-134.

Marteau, P., Flourie, B., Pochart, P., Chastang, C., Desjeux, J.-F. & Rambaud, J.-C. (1990). Effect of the microbial lactase (EC 3.2.1.23) activity in yoghurt on the intestinal absorption of lactose: An in vivo study in lactase-deficient humans. *British Journal of Nutrition* **64**, 71-79.

Martini, M., Lerebours, E., Lin, W., Harlander, S., Berrada, N., Antoine, J. & Savaiano, D. (1991). Strains and species of lactic acid bacteria in fermented milks (yogurts): effect on in vivo lactose digestion. *The American Journal of Clinical Nutrition* **54**, 1041-1046.

Marty-Teyssset, C., de la Torre, F. & Garel, J.-R. (2000). Increased Production of Hydrogen Peroxide by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* upon Aeration: Involvement of an NADH Oxidase in Oxidative Stress. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 262-267.

Mater, D. D., Bretigny, L., Firmesse, O., Flores, M. J., Mogenet, A., Bresson, J. L. & Corthier, G. (2005). *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* survive gastrointestinal transit of healthy volunteers consuming yogurt. *FEMS Microbiol Lett* **250**, 185-187.

Mater, D. D., Drouault-Holowacz, S., Oozeer, R., Langella, P., Anba, J. & Corthier, G. (2006). Beta-galactosidase production by *Streptococcus thermophilus* is higher in the small intestine than in the caecum of human-microbiota-associated mice after lactose supplementation. *Br J Nutr* **96**, 177-181.

Mattick, K. L., J rgensen, F., Legan, J. D., Cole, M. B., Porter, J., Lappin-Scott, H. M. & Humphrey, T. J. (2000). Survival and Filamentation of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis PT4 and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104 at Low Water Activity. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 1274-1279.

McNulty, N. P., Yatsunenko, T., Hsiao, A. & other authors (2011). The Impact of a Consortium of Fermented Milk Strains on the Gut Microbiome of Gnotobiotic Mice and Monozygotic Twins. *Science Translational Medicine* **3**, 106ra106.

Mellefont, L. A., McMeekin, T. A. & Ross, T. (2005). Viable count estimates of lag time responses for *Salmonella typhimurium* M48 subjected to abrupt osmotic shifts. *International Journal of Food Microbiology* **105**, 399-410.

Mercade, M., Duperray, F. & Loubi re, P. (2003). Transient self-inhibition of the growth of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in a pH-regulated fermentor. *Biotechnology and Bioengineering* **84**, 78-87.

Meyer, A. L., Elmadfa, I., Herbacek, I. & Micksche, M. (2007). Probiotic, as well as conventional yogurt, can enhance the stimulated production of proinflammatory cytokines. *Journal of Human Nutrition and Dietetics* **20**, 590-598.

Milinovich, G. J., Burrell, P. C., Pollitt, C. C., Bouvet, A. & Trott, D. J. (2008). *Streptococcus henryi* sp. nov. and *Streptococcus caballi* sp. nov., isolated from the hindgut of horses with oligofructose-induced laminitis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**, 262-266.

Miteva, V., Stefanova, T., Budakov, I., Ivanova, I., Mitev, V., Gancheva, A. & Ljubenov, M. (1998). Characterization of Bacteriocins Produced by Strains from Traditional Bulgarian Dairy Products. *Systematic and Applied Microbiology* **21**, 151-161.

Monnet, C. & Corrieu, G. (2007). Selection and properties of $\hat{\pm}$ -acetolactate decarboxylase-deficient spontaneous mutants of *Streptococcus thermophilus*. *Food Microbiology* **24**, 601-606.

Morrison, D. J., Mackay, W. G., Edwards, C. A., Preston, T., Dodson, B. & Weaver, L. T. (2006). Butyrate production from oligofructose fermentation by the human faecal flora: what is the contribution of extracellular acetate and lactate?. *British Journal of Nutrition* **96**, 570-577.

Nagai, T., Makino, S., Ikegami, S., Itoh, H. & Yamada, H. (2011). Effects of oral administration of yogurt fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1 and its exopolysaccharides against influenza virus infection in mice. *International Immunopharmacology* **11**, 2246-2250.

Narushima, S., Sakata, T., Hioki, K., Itoh, T., Nomura, T. & Itoh, K. (2010). Inhibitory Effect of Yogurt on Aberrant Crypt Foci Formation in the Rat Colon and Colorectal Tumorigenesis in RasH2 Mice. *Experimental Animals* **59**, 487-494.

Nikooyeh, B., Neyestani, T. R., Farvid, M. & other authors (2011). Daily consumption of vitamin D or vitamin D + calcium fortified yogurt drink improved glycemic control in patients with type 2 diabetes: a randomized clinical trial. *The American Journal of Clinical Nutrition* **93**, 764-771.

Nougayrede, J.-P., Taieb, F., Rycke, J. D. & Oswald, E. (2005). Cyclomodulins: bacterial effectors that modulate the eukaryotic cell cycle. *Trends in Microbiology* **13**, 103-110.

Obépi-Roche (2009). Enquête épidémiologique nationale sur le surpoids et l'obésité.

Oberg, C. J., Wang, A., Moyes, L. V., Brown, R. J. & Richardson, G. H. (1991). Effects of Proteolytic Activity of Thermolactic Cultures on Physical Properties of Mozzarella Cheese. *Journal of dairy science* **74**, 389-397.

Oku, T., Tanabe, K., Ogawa, S., Sadamori, N. & Nakamura, S. (2011). Similarity of hydrolyzing activity of human and rat small intestinal disaccharidases. *Clinical and Experimental Gastroenterology* **4**, 155–161.

Oliveira, R. P. S., Florence, A. C. R., Silva, R. C., Perego, P., Converti, A., Gioielli, L. A. & Oliveira, M. N. (2009). Effect of different prebiotics on the fermentation kinetics, probiotic survival and fatty acids profiles in nonfat symbiotic fermented milk. *International Journal of Food Microbiology* **128**, 467-472.

Onwulata, C., Rao, D. & Vankineni, P. (1989). Relative efficiency of yogurt, sweet acidophilus milk, hydrolyzed- lactose milk, and a commercial lactase tablet in alleviating lactose maldigestion. *The American Journal of Clinical Nutrition* **49**, 1233-1237.

Oozeer, R., Goupil-Feuillerat, N., Alpert, C. A., van de Guchte, M., Anba, J., Mengaud, J. & Corthier, G. (2002). Lactobacillus casei Is Able To Survive and Initiate Protein Synthesis during Its Transit in the Digestive Tract of Human Flora-Associated Mice. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 3570-3574.

Oozeer, R., Furet, J. P., Goupil-Feuillerat, N., Anba, J., Mengaud, J. & Corthier, G. (2005). Differential Activities of Four Lactobacillus casei Promoters during Bacterial Transit through the Gastrointestinal Tracts of Human-Microbiota-Associated Mice. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 1356-1363.

Ott, A., Germond, J.-E. & Chaintreau, A. (2000). Origin of Acetaldehyde during Milk Fermentation Using ¹³C-Labeled Precursors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 1512-1517.

Pala, V., Sieri, S., Berrino, F. & other authors (2011). Yogurt consumption and risk of colorectal cancer in the Italian European prospective investigation into cancer and nutrition cohort. *International Journal of Cancer* **129**, 2712-2719.

Pelletier, X., Laure-Boussuge, S. & Donazzolo, Y. (2001a). Hydrogen excretion upon ingestion of dairy products in lactose-intolerant male subjects: importance of the live flora. *European Journal of Clinical Nutrition* **55**, 509-512.

Pelletier, X., Laure-Boussuge, S. & Donazzolo, Y. (2001b). Hydrogen excretion upon ingestion of dairy products in lactose-intolerant male subjects: importance of the live flora. *European Journal of Clinical Nutrition* **55**, 509-512.

- Penders, J., Thijs, C., Vink, C., Stelma, F. F., Snijders, B., Kummeling, I., van den Brandt, P. A. & Stobberingh, E. E. (2006). Factors Influencing the Composition of the Intestinal Microbiota in Early Infancy. *Pediatrics* **118**, 511-521.
- Perdigón, G., LeBlanc, A. d. M. d., Valdez, J. & Rachid, M. (2002). Role of yoghurt in the prevention of colon cancer. *European Journal of Clinical Nutrition* **56**, 65-68.
- Perez, P. F., Dorado, J. I., Leclerc, M., Levenez, F., Benyacoub, J., Serrant, P., Segura-Roggero, I., Schiffrin, E. J. & Donnet-Hughes, A. (2007). Bacterial Imprinting of the Neonatal Immune System: Lessons From Maternal Cells? *Pediatrics* **119**, e724-e732.
- Petersen, C. (2005). D-lactic acidosis. *Nutr Clin Pract* **20**, 634-645.
- Pette, J. W. & Lolkema, H. (1950). Symbiosis and antibiosis in mixed cultures *Lb. bulgaricus* and *S. thermophilus*. *Neth Milk Dairy J* **4**, 197-208.
- Pitino, I., Randazzo, C. L., Mandalari, G., Lo Curto, A., Faulks, R. M., Le Marc, Y., Bisignano, C., Caggia, C. & Wickham, M. S. J. (2010). Survival of *Lactobacillus rhamnosus* strains in the upper gastrointestinal tract. *Food Microbiology* **27**, 1121-1127.
- Pombert, J.-F., Sistek, V., Boissinot, M. & Frenette, M. (2009). Evolutionary relationships among salivarius streptococci as inferred from multilocus phylogenies based on 16S rRNA-encoding, *recA*, *secA*, and *secY* gene sequences. *BMC Microbiology* **9**, 232.
- Poolman, B., Royer, T. J., Mainzer, S. E. & Schmidt, B. F. (1990). Carbohydrate utilization in *Streptococcus thermophilus*: characterization of the genes for aldose 1-epimerase (mutarotase) and UDPglucose 4-epimerase. *Journal of Bacteriology* **172**, 4037-4047.
- Poolman, B., Knol, J., Van Der Does, C., Henderson, P. J. F., Liang, W.-J., Leblanc, G., Pourcher, T. & Mus-Veteau, I. (1996). Cation and sugar selectivity determinants in a novel family of transport proteins. *Molecular Microbiology* **19**, 911-922.
- Poyart, C., Quesne, G., Coulon, S., Berche, P. & Trieu-Cuot, P. (1998). Identification of *Streptococci* to Species Level by Sequencing the Gene Encoding the Manganese-Dependent Superoxide Dismutase. *J Clin Microbiol* **36**, 41-47.
- Qin, J., Li, R., Raes, J. & other authors (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**, 59-65.
- Rachid, M., Gobbato, N., Valdéz, J., Vitalone, H. & Perdigón, G. (2002). Effect of yogurt on the inhibition of an intestinal carcinoma by increasing cellular apoptosis. *Int J Immunopathol Pharmacol* **15**, 209-216.
- Rasmussen, T. B., Danielsen, M., Valina, O., Garrigues, C., Johansen, E. & Pedersen, M. B. (2008). *Streptococcus thermophilus* Core Genome: Comparative Genome Hybridization Study of 47 Strains. *Applied and Environmental Microbiology* **74**, 4703-4710.
- Rizkalla, S. W., Luo, J., Kabir, M., Chevalier, A., Pacher, N. & Slama, G. r. (2000). Chronic consumption of fresh but not heated yogurt improves breath-hydrogen status and short-chain fatty acid profiles: a controlled study in healthy men with or without lactose maldigestion. *The American Journal of Clinical Nutrition* **72**, 1474-1479.

- Rosado, J., Solomons, N. & Allen, L. (1992).** Lactose digestion from unmodified, low-fat and lactose-hydrolyzed yogurt in adult lactose-maldigesters. *Eur J Clin Nutr* **46**, 61-67.
- Roy, K., Anba, J., Corthier, G., Rigottier-Gois, L., Monnet, V. & Mistou, M.-Y. (2008a).** Metabolic Adaptation of *Lactococcus lactis* in the Digestive Tract: The Example of Response to Lactose. *J Mol Microbiol Biotechnol* **14**, 137-144.
- Roy, K., Meyrand, M., Corthier, G., Monnet, V. & Mistou, M. Y. (2008b).** Proteomic investigation of the adaptation of *Lactococcus lactis* to the mouse digestive tract. *Proteomics* **8**, 1661-1676.
- Rul, F. & Monnet, V. (1997).** Presence of additional peptidases in *Streptococcus thermophilus* CNRZ 302 compared to *Lactococcus lactis*. *J Appl Microbiol* **82**, 695-704.
- Rul, F., Ben-Yahia, L., Chegdani, F. & other authors (2011).** Impact of the metabolic activity of *Streptococcus thermophilus* on the colon epithelium of gnotobiotic rats. *J Biol Chem* **286**, 10288-10296.
- Saavedra, J. M., Abi-Hanna, A., Moore, N. & Yolken, R. H. (2004).** Long-term consumption of infant formulas containing live probiotic bacteria: tolerance and safety. *The American Journal of Clinical Nutrition* **79**, 261-267.
- Sancho, E., Batlle, E. & Clevers, H. (2004).** SIGNALING PATHWAYS IN INTESTINAL DEVELOPMENT AND CANCER. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **20**, 695-723.
- Sanders, J. W., Leenhouts, K. J., Haandrikman, A. J., Venema, G. & Kok, J. (1995).** Stress response in *Lactococcus lactis*: cloning, expression analysis, and mutation of the lactococcal superoxide dismutase gene. *Journal of Bacteriology* **177**, 5254-5260.
- Sato, T., Matsumoto, K., Okumura, T., Yokoi, W., Naito, E., Yoshida, Y., Nomoto, K., Ito, M. & Sawada, H. (2008).** Isolation of lactate-utilizing butyrate-producing bacteria from human feces and in vivo administration of *Anaerostipes caccae* strain L2 and galacto-oligosaccharides in a rat model. *FEMS Microbiology Ecology* **66**, 528-536.
- Savaiano, D., AbouElAnouar, A., Smith, D. & Levitt, M. (1984).** Lactose malabsorption from yogurt, pasteurized yogurt, sweet acidophilus milk, and cultured milk in lactase-deficient individuals. *The American Journal of Clinical Nutrition* **40**, 1219-1223.
- Schleifer, K. H., Ehrmann, M., Krusch, U. & Neve, H. (1991).** Revival of the Species *Streptococcus thermophilus* (ex *Orla-Jensen*, 1919) nom. rev. *Systematic and Applied Microbiology* **14**, 386-388.
- Schroeter, J. & Klaenhammer, T. (2009).** Genomics of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **292**, 1-6.
- Shahani, K. M. & Chandan, R. C. (1979).** Nutritional and Healthful Aspects of Cultured and Culture-Containing Dairy Foods¹. *Journal of dairy science* **62**, 1685-1694.
- Shahbal, S., Hemme, D. & Desmazeaud, M. (1991).** High cell wall-associated proteinase activity of some *Streptococcus thermophilus* strains (H-strains) correlated with a high acidification rate in milk. *Lait* **71**, 351-357.

Shermak, M., Saavedra, J., Jackson, T., Huang, S., Bayless, T. & Perman, J. (1995). Effect of yogurt on symptoms and kinetics of hydrogen production in lactose-malabsorbing children. *The American Journal of Clinical Nutrition* **62**, 1003-1006.

Sherman, J. M. (1937). THE STREPTOCOCCI. *Bacteriol Rev* **1**, 3-97.

Shewmaker, P. L., Camus, A. C., Bailiff, T., Steigerwalt, A. G., Morey, R. E. & Carvalho, M. d. G. r. S. (2007). *Streptococcus ictaluri* sp. nov., isolated from Channel Catfish *Ictalurus punctatus* broodstock. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**, 1603-1606.

Sieuwerts, S., de Bok, F. A., Hugenholtz, J. & van Hylckama Vlieg, J. E. (2008). Unraveling microbial interactions in food fermentations: from classical to genomics approaches. *Appl Environ Microbiol* **74**, 4997-5007.

Sieuwerts, S., Molenaar, D., van Hijum, S. A. & other authors (2010). Mixed-culture transcriptome analysis reveals the molecular basis of mixed-culture growth in *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *Appl Environ Microbiol* **76**, 7775-7784.

Simone, C. D., Tzantzoglou, S., Baldinelli, L., Difabio, S., Bianchi-Salvadori, B., Jirillo, E. & Vesely, R. (1988). Enhancement of host resistance against *Salmonella typhimurium* infection by a diet supplemented with yogurt. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* **10**, 399-415.

Smart, J. B. & Thomas, T. D. (1987). Effect of Oxygen on Lactose Metabolism in Lactic Streptococci. *Appl Environ Microbiol* **53**, 533-541.

Sodini, I., Latrille, E. & Corrieu, G. (2000). Identification of interacting mixed cultures of lactic acid bacteria by their exclusion from a model predicting the acidifying activity of non-interacting mixed cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology* **54**, 715-718.

Solis-Pereyra, B., Aattouri, N. & Lemonnier, D. (1997). Role of food in the stimulation of cytokine production. *The American Journal of Clinical Nutrition* **66**, 521S-525S.

Solis, G., de los Reyes-Gavilan, C. G., Fernandez, N., Margolles, A. & Gueimonde, M. (2010). Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast-milk and the infant gut. *Anaerobe* **16**, 307-310.

Sonnenburg, J. L., Chen, C. T. L. & Gordon, J. I. (2006). Genomic and Metabolic Studies of the Impact of Probiotics on a Model Gut Symbiont and Host. *PLoS Biol* **4**, e413.

Stulke, J. & Hillen, W. (2000). REGULATION OF CARBON CATABOLISM IN BACILLUS SPECIES. *Annual Review of Microbiology* **54**, 849-880.

Sun, Z., Chen, X., Wang, J. & other authors (2010). Complete Genome Sequence of *Streptococcus thermophilus* Strain ND03. *Journal of Bacteriology* **193**, 793-794.

SYNDIFRAIS, A. G. (2011). La collective des PLF (Produits Laitiers Frais) renforce ses engagements en 2011. *Communiqué de presse 31 mars 2011*.

Takada, K. & Hirasawa, M. (2008). *Streptococcus dentiroussetti* sp. nov., isolated from the oral cavities of bats. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**, 160-163.

Tamime, A. & Robinson, R. (1999). Yoghurt science and technology. *Woodhead Publishing Limited, Cambridge, United Kingdom*, (2nd ed.).

Tamime, S. & Deeth, N. (1980). *Manual Analysis of Milk Products*. New York.: McGraw Hill Co. Ltd.

Tap, J., Mondot, S., Levenez, F. & other authors (2009). Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environ Microbiol* **11**, 2574-2584.

Tazoe, H., Otomo, Y., Kaji, I., Tanaka, R., Karaki, S. & Kuwahara, A. (2008). Roles of short-chain fatty acids receptors, GPR41 and GPR43 on colonic functions. *J Physiol Pharmacol* **59** 251-262.

Tettelin, H., Massignani, V., Cieslewicz, M. J. & other authors (2002). Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human pathogen, serotype V *Streptococcus agalactiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 12391-12396.

Thomas, M., Wrzosek, L., Ben-Yahia, L. & other authors (2011). Carbohydrate metabolism is essential for the colonization of *Streptococcus thermophilus* in the digestive tract of gnotobiotic rats. *PLoS One* **6(12)**: e28789.

Thomas, T. D. & Crow, V. L. (1984). Selection of Galactose-Fermenting *Streptococcus thermophilus* in Lactose-Limited Chemostat Cultures. *Appl Environ Microbiol* **48**, 186–191. .

Thomas, T. D. & Pritchard, G. G. (1987). Proteolytic enzymes of dairy starter cultures. *FEMS Microbiology Letters* **46**, 245-268.

Tiiu Kullisaar, E. S., Marika Mikelsaar, Kersti Zilmer, Tiiu Vihalemm and Mihkel Zilmer (2003). Antioxidative probiotic fermented goats' milk decreases oxidative stress-mediated atherogenicity in human subjects. *British Journal of Nutrition* **90** 449-456

Topping, D. L. & Clifton, P. M. (2001). Short-Chain Fatty Acids and Human Colonic Function: Roles of Resistant Starch and Nonstarch Polysaccharides. *Physiological Reviews* **81**, 1031-1064.

Trieu-Cuot, P. & Courvalin, P. (1983). Nucleotide sequence of the *Streptococcus faecalis* plasmid gene encoding the 3'5''-aminoglycoside phosphotransferase type III. *Gene* **23**, 331-341.

Tsuchiya, A., Almiron-Roig, E., Lluch, A., Guyonnet, D. & Drewnowski, A. (2006). Higher Satiety Ratings Following Yogurt Consumption Relative to Fruit Drink or Dairy Fruit Drink. *Journal of the American Dietetic Association* **106**, 550-557.

Turner, K. W. & Martley, F. G. (1983). Galactose Fermentation and classification of thermophilic *Lactobacilli*. *Applied and Environmental Microbiology* **45**, 1932-1934.

Uribarri, J. M. D., Oh, M. S. M. D. & Carroll, H. J. M. D. (1998). D-Lactic Acidosis: A Review of Clinical Presentation, Biochemical Features, and Pathophysiologic Mechanisms. *Medecine* **77**, 73-82.

Uribe-Esquivel, M., Moran, S., Poo, J. & Muñoz, R. (1997). In vitro and in vivo lactose and lactulose effects on colonic fermentation and portal-systemic encephalopathy parameters. *Scand J Gastroenterol* **222**, 49-52.

Vaillancourt, K., Moineau, S., Frenette, M., Lessard, C. & Vadeboncoeur, C. (2002). Galactose and Lactose Genes from the Galactose-Positive Bacterium *Streptococcus salivarius* and the

Phylogenetically Related Galactose-Negative Bacterium *Streptococcus thermophilus*: Organization, Sequence, Transcription, and Activity of the gal Gene Products. *Journal of Bacteriology* **184**, 785-793.

Vaillancourt, K., LeMay, J.-D., Lamoureux, M., Frenette, M., Moineau, S. & Vadeboncoeur, C. (2004). Characterization of a Galactokinase-Positive Recombinant Strain of *Streptococcus thermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 4596-4603.

Vaishampayan, P. A., Kuehl, J. V., Froula, J. L., Morgan, J. L., Ochman, H. & Francino, M. P. (2010). Comparative Metagenomics and Population Dynamics of the Gut Microbiota in Mother and Infant. *Genome Biology and Evolution* **2**, 53-66.

Van De Guchte, M., Ehrlich, S. D. & Maguin, E. (2001). Production of growth-inhibiting factors by *Lactobacillus delbrueckii*. *Journal of Applied Microbiology* **91**, 147-153.

Van De Guchte, M., Penaud, S., Grimaldi, C. & other authors (2006). The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* reveals extensive and ongoing reductive evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 9274-9279.

Van de Water, J., Keen, C. L. & Gershwin, M. E. (1999). The Influence of Chronic Yogurt Consumption on Immunity. *The Journal of Nutrition* **129**, 1492.

Van den Bogaard, P. T. C., Kleerebezem, M., Kuipers, O. P. & de Vos, W. M. (2000). Control of Lactose Transport, β -Galactosidase Activity, and Glycolysis by CcpA in *Streptococcus thermophilus*: Evidence for Carbon Catabolite Repression by a Non-Phosphoenolpyruvate-Dependent Phosphotransferase System Sugar. *Journal of Bacteriology* **182**, 5982-5989.

Van den Bogaard, P. T. C., HOIs, P., Kleerebezem, M., Kuipers, O. P. & de Vos, W. M. (2004). Sugar utilisation and conservation of the gal-lac gene cluster in *Streptococcus thermophilus*. *Syst Appl Microbiol* **27**, 10-17.

van Hylckama Vlieg, J. E. T., Veiga, P., Zhang, C., Derrien, M. & Zhao, L. (2010). Impact of microbial transformation of food on health from fermented foods to fermentation in the gastro-intestinal tract. *Current Opinion in Biotechnology* **22**, 211-219.

Varela-Moreiras, G., Antoine, J., Ruiz-Roso, B. & Varela, G. (1992). Effects of yogurt and fermented-then-pasteurized milk on lactose absorption in an institutionalized elderly group. *J Am Coll Nutr* **11**, 168-171.

Vaughan, E. E., van den Bogaard, P. T. C., Catzeddu, P., Kuipers, O. P. & de Vos, W. M. (2001). Activation of Silent gal Genes in the lac-gal Regulon of *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Bacteriology* **183**, 1184-1194.

Veiga, P., Gallini, C. A., Beal, C. & other authors (2010). *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* fermented milk product reduces inflammation by altering a niche for colitogenic microbes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 18132-18137.

Vela, A. I., Perez, M., Zamora, L., Palacios, L., Domínguez, L. & Fernández-Garayz  bal, J. F. (2009). *Streptococcus porci* sp. nov., isolated from swine sources. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**, 104-108.

Vernia, P., Caprilli, R., Latella, G., Barbetti, F., Magliocca, F. & Cittadini, M. (1988). Fecal lactate and ulcerative colitis. *Gastroenterology* **95**, 1546-1548.

Weickert, M. J. & Chambliss, G. H. (1990). Site-directed mutagenesis of a catabolite repression operator sequence in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **87**, 6238-6242.

Zourari, A., Accolas, J. P. & Desmazeaud, M. J. (1992). Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria. *Le Lait* **72**, 1-6.

Résumé :

L'amélioration de la digestion de lactose est une allégation «santé» liée aux ferments vivants du yaourt : *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*) et *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* (*L. bulgaricus*) validée par l'EFSA en 2010. La physiologie de *S. thermophilus* et de *L. bulgaricus* est connue dans le lait et particulièrement le yaourt, alors qu'elle n'a été que peu étudiée dans le tractus digestif (TD).

Mon travail de thèse est basé sur l'hypothèse de travail suivante : l'utilisation de modèles animaux gnotobiotiques permet de mieux connaître la physiologie des bactéries lactiques et de proposer des mécanismes d'action de leurs effets « santé ». La stratégie a donc été d'obtenir des animaux mono-associés avec chacune des deux bactéries du yaourt ou les deux en même temps. Les principaux résultats obtenus sont :

1/ *S. thermophilus* colonise le TD en s'adaptant progressivement à l'environnement colique et y induit une glycolyse massive et une production de lactate. La glycolyse est la signature majeure de *S. thermophilus* dans le TD et le lactate pourrait être la molécule « signal » qui induit une réponse chez l'hôte par une augmentation des transporteurs de mono-carboxylates (SLC16A1 et SLC5A8) et d'une protéine impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire p27^{kip1}.

2/ L'apport de lactose stimule la colonisation du TD, la glycolyse ainsi que la production de L-lactate par *S. thermophilus in vivo*.

3/ Contrairement à ce qui est observé pour *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* ne s'implante pas en absence de lactose. Quand les deux bactéries sont en co-culture, *S. thermophilus* est toujours avantagé numériquement par rapport à *L. bulgaricus* aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*.

Au niveau nutritionnel, tous nos résultats sont cohérents avec les allégations « santé » du yaourt avec un effet prébiotique du lactose. L'étude d'animaux gnotobiotiques a permis de proposer des nouvelles voies de régulation du métabolisme des sucres de bactéries lactiques et de nouvelles voies moléculaires (*via* le lactate) par lesquelles des bactéries lactiques pourraient influencer la physiologie de l'hôte.

Mots clés :

Streptococcus thermophilus, yaourt, lactose, lactate, tractus digestif, rats gnotobiotiques.