



**HAL**  
open science

# Réponses de *Streptococcus salivarius* K12 à l'environnement et à la dynamique de la bouche simulés en bioréacteur

Perrine Roger

► **To cite this version:**

Perrine Roger. Réponses de *Streptococcus salivarius* K12 à l'environnement et à la dynamique de la bouche simulés en bioréacteur. Biochimie, Biologie Moléculaire. AgroParisTech, 2011. Français. NNT : 2011AGPT0071 . pastel-01061385

**HAL Id: pastel-01061385**

**<https://pastel.hal.science/pastel-01061385>**

Submitted on 5 Sep 2014

**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 : Génie Microbiologique

*présentée et soutenue publiquement par*

**Perrine ROGER**

le 2 décembre 2011

## Réponses de *Streptococcus salivarius* K12 à l'environnement et à la dynamique de la bouche simulés en bioréacteur

Directeur de thèse : **Catherine BEAL**

### Jury

**Mme Cécile BADET**, Maître de Conférences et Praticien Hospitalier, Université de Bordeaux

**Mme Catherine BEAL**, Professeur, AgroParisTech, Grignon

**Mme Marielle BOUX**, Professeur, AgroParisTech, Grignon

**M. Eric GUEDON**, Chargé de Recherches, INRA, Jouy-en Josas

**M. Pascal LOUBIERE**, Directeur de Recherches, INRA, Toulouse

**Mme Françoise RUL**, Chargée de Recherches, INRA, Jouy-en Josas

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Rapporteur

Examineur



# Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires (UMR GMPA) de l'INRA de Grignon, initialement sous la direction de **Mme Michèle Marin** puis de **Mme Isabelle Souchon**, que je remercie successivement pour leur accueil et pour m'avoir donné les moyens nécessaires pour réaliser ce travail dans les meilleures conditions.

Je remercie également **M. Pascal Loubière**, Directeur de recherche à l'INRA de Toulouse, et **Mme Cécile Badet**, Maître de conférences et praticien hospitalier à l'université de Bordeaux, pour avoir accepté d'assumer la charge de rapporteur de cette thèse. Merci également aux autres membres du jury qui ont accepté de lire et d'examiner ce travail : **Mme Françoise Rul**, chargé de recherche à l'INRA de Jouy-en-Josas, **M. Eric Guédon**, chargé de recherche à l'INRA de Jouy-en-Josas et **Mme Marielle Bouix**, Professeur à AgroParisTech.

Je tiens tout particulièrement à exprimer ma sincère reconnaissance et ma profonde gratitude à mon encadrante de thèse, **Mme Catherine Béal**, Professeur à AgroParisTech, pour la confiance qu'elle m'a toujours accordée et pour l'intérêt permanent qu'elle a porté à la réalisation de ce travail. Depuis déjà 6 ans et mes débuts d'étudiante en fermentation, j'ai beaucoup appris à ton contact, aussi bien d'un point de vue scientifique, professionnel qu'humain. Merci à toi Catherine de m'avoir fait bénéficier de tes larges compétences et pour m'avoir soutenue et encouragée. Me laissant toute l'autonomie dont j'avais besoin, tu t'es montrée disponible lorsque cela était nécessaire et m'a fait partager ta rigueur scientifique et ton regard critique sur mes résultats. Merci, tout simplement.

Merci également aux membres de mon comité de thèse, **Françoise Rul**, **Eric Guédon**, **Valérie Roger** et **Gilles Féron**. Je n'ai pas eu le privilège de tous vous côtoyer régulièrement mais vos commentaires, lors de nos rencontres, ont toujours su m'aiguiller vers de nouvelles pistes qui m'ont permis de fournir un travail de meilleure qualité.

Je tiens bien sûr à remercier tous les membres de l'équipe « bactéries alimentaires et commensales » et notamment : **Pierre Renault**, **Eric Guédon** (encore !), **Christine Delorme**, **Nicolas Pons** (pour la réalisation des puces), **Céline Gautier**, **Nicolas Sanchez**, **Séverine Layec**, **Ghalia Kaci** (l'autre thésarde *salivarius*), et **Benoit Couvigny** (le prochain thésard *salivarius*!).

Nos réunions régulières et vos conseils constructifs m'ont permis la remise en question nécessaire pour avancer dans un projet de thèse. Ce fut également très agréable de pouvoir échanger ensemble sur cette passionnante bactérie buccale qu'est *S. salivarius*. Un merci tout particulier à **Eric** pour ses conseils et pour le temps passé sur le traitement et l'analyse des données transcriptomiques qui, je le sais maintenant, demandent un sacré investissement. Je n'oublie pas non plus **Céline**, qui patiemment m'a fait découvrir les techniques de biologie moléculaire et dont l'aide a été indispensable dans la réalisation des manip. Merci aussi pour ta gentillesse et ta grande disponibilité. Merci aussi à tous les autres personnes du 440 que j'ai pu rencontrer et qui ont rendu très agréables mes séjours « transcripto » à jouy.

Mes remerciements s'adressent aussi à tous ceux qui m'ont aidé dans la réalisation de cette thèse. Je tiens tout d'abord à remercier **Sirikarn Harn-arsa**, ma petite stagiaire pendant 10 mois. Toujours enthousiaste, dynamique et joyeuse, elle s'est investie à fond dans son projet et m'a apporté une très grande aide ! Un grand merci à **Jérôme Delettre** pour son aide, notamment en protéomique, son grand domaine d'expertise ! Ta grande gentillesse et tes conseils ont également été une grande aide en cette fin de thèse. Je remercie également **Sarah Ghorbal** et **Marielle Bouix** pour leur aide technique et théorique autour de la cytométrie en flux. Merci aussi à **Aljosa Trmcic** venu quelques mois au labo, toujours prévenant et joyeux, qui m'a beaucoup guidé dans la détection des activités bactériocines.

Merci également à tous les membres du GMPA pour leur accueil: **Caroline** (merci pour tout), **Francoise, Fernanda, Julie, Sandra, Cécile** (merci pour vos précieux conseils), Hervé, Bruno et **les gars de l'atelier** (que j'ai embêté plus d'une fois et qui ont toujours répondu présents), **Anne-so** toujours disponible, nos discussions scientifiques (et personnelles !) ont été ma bouffée d'air frais. Un grand merci également à **Claire**, qui depuis son arrivée toute récente au GMPA m'a beaucoup aidé, à tout point de vue. Ton dynamisme, ta gentillesse et ton naturel sont des qualités précieuses ! Merci aux autres : **Sophie, Christophe, Stéphanie P** et **Stéphanie C** (je vais enfin te rendre la perforeuse !), **Jessie, Pascal, Anne, Maud, Marwen, Violaine, Armelle, Pascale, Thomas, Daniel, Isabelle(s) D** et **M**, la **baronne** (et ses fameuses imitations !), **Thibaut, Marie-Noëlle, David F, Sébastien, Steven, Michel, David L**. Vos sourires et vos attentions ont fait la richesse de ces 3 années.

Je n'oublie pas non plus tous les stagiaires et les thésards (post-docs et assimilés) croisés au cours de ces 3 ans, ceux déjà partis (merci tout spécial à **Aline** et **Marie Pierre**), et ceux qui sont encore là : Les **Julies, Joshua, Reine** (courage ma belle ;-)), **Ana Carolina** et **Hélène**, avec une

note spéciale pour deux de mes co-thésards Catherinien : **Yohan** (fournisseur officiel de gateaux, de conseils et de pause !!) et **Séverine**, l'autre agent 007 (je sais, c'est du réchauffé !!). Merci à tous pour tous ces bons moments (tennis, bataille de boules de neige, bowling (si quand même), bad', soirée jeux..), votre amitié et votre soutien m'ont été d'une grande aide.

Spéciale dédicace à tous mes correcteurs orthographiques (et autres) vivants : **Clarence** (ma correctrice attitrée pour la biblio !), **Céline**, **Yohan** (encore lui !), **Claire** (encore elle !), **Caroline**, **Solène**, **Fabien**, **Séverine**, **Loris** (le petit dernier du bureau), mon père, mon oncle, mon papy, et tous les autres ... . Merci aussi à **Stéphane** et **Romain**, qui ont mis à profit leur talent de logisticiens pour m'aider dans la composition de la salive.

Un grand merci à toute ma famille et mes amis pour leur soutien. **Cécile**, **Maelenn**, **Cathy**, **Mickael**, **Flo**, **Yoyo** (déjà !), Stéphane et tous les autres, vous m'avez permis de prendre du recul par rapport aux difficultés rencontrées en m'accompagnant dans les moments heureux. Un grand merci en particulier à **mes parents** pour m'avoir soutenue pendant mes (longues) années d'études et avoir cru en moi. Merci aussi à **Soso** et **Lulu** pour la perpétuelle compétition (à toi de jouer maintenant) et les parties détentes Ultrastar. Merci à mes approvisionneurs fruits et légumes variés bio: **papy** et **mémé**. Enfin, une pensée toute particulière pour ma **mamie** qui, je pense, aurait été fière que j'y sois arrivée....

Et enfin, le plus grand des mercis à **Tony** : tour à tour correcteur, coach, dépanneur et programmeur informatique, psychologue, tu as toujours été là ! Cette thèse est aussi la tienne...



# Liste des publications

## Publications dans des revues à comité de lecture

**Roger P**, Delettre J, Bouix M, Béal C (2011a) Characterization of *Streptococcus salivarius* growth and maintenance in artificial saliva. *Journal of Applied Microbiology* 111:631-641

**Roger P**, Harn-Arsa S, Delettre J, Béal C (2011b) Salivary enzymes and exhaled air affect *Streptococcus salivarius* growth and physiological state in complemented artificial saliva. *Archives of Microbiology* DOI 10.1007/s00203-011-0746-1

## Communications lors de congrès

### Communications orales

**Roger P**, Delettre J, Rault A, Béal C. Multi-scale comparison of an “artificial saliva” and a reference medium on the physiological characteristics of the oral bacterium *S. salivarius*. 17ème colloque du Club des Bactéries lactiques: 27-29 octobre 2010, Nancy, France.

**Roger P**, Harn-Arsa S, Béal C. Effect of salivary enzymes and “expired air” on growth and maintenance of the oral bacteria *Streptococcus salivarius* K12. European Oral Microbiology Workshop : 19-22 Mai 2011, Zeist, Pays-Bas.

### Communications affichées

**Roger P**. Création d’une « salive artificielle » et caractérisation de son effet sur la culture de la bactérie buccale *Streptococcus salivarius*. Journées de l’Ecole Doctorale ABIÉS : 1-2 avril 2010, Paris, France. Obtention du prix du meilleur poster.

**Roger P**, Delettre J, Rault A, Béal C. Comparaison de la croissance de *S. salivarius* dans un milieu de référence et dans une « salive artificielle ». Journées des Microbiologistes de l’INRA : 5-7 mai 2010, Poitiers, France.

**Roger P**, Delettre J, Rault A, Béal C. Comparison of an “artificial saliva” and a reference medium on the physiological characteristics of the oral bacterium *S. salivarius*. *Microbes for Health*: 22-23 novembre 2010, Paris, France.



**Roger P**, Rault A, Béal C. Physiological parameters measured by flow cytometry allows characterizing the behaviour of *streptococcus salivarius* in “artificial saliva”. Microbiologie et cytométrie en flux: 28 février 2011, Paris, France.

**Roger P**, Guédon E, Gautier C, Pons N, Béal C. Continuous cultures in artificial saliva confirm that *Streptococcus salivarius* is well adapted to mouth conditions. LAB 10<sup>th</sup>: 28 aout-1 septembre 2011, Egmond aan Zee, Pays-Bas.

## Liste des abréviations

2D	Electrophorèse bidimensionnelle
ADNc	ADN complémentaire
ARNm	ARN messenger
ATP	Adénosine triphosphate
CAS	Complemented Artificial Saliva
CDFE	Constant Depth Film Fermenter
cF	Carboxyfluorescéine
cFDA	Diacétate de carboxyfluorescéine
cFDA-SE	Diacétate de carboxyfluorescéine succinimidyl ester
Ct	Threshold cycle
DiBAC <sub>4</sub> (3)	Bis-(1,3-dibutylbarbituric acid)-trimethine oxonol
$\Delta$ IF	Vitalité cellulaire (en %)
$\Delta\Psi$	Potentiel de membrane
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EFSA	European Food Safety Authority
<i>Eh</i>	Potentiel d'oxydo-réduction
EPS	Exopolysaccharide
FSC	Forward-angle light scatter
FTF	Fructosyltransférase
GTF	Glucosyltransférase
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
HSP	Horseshoe peroxydase
IF	Intensité de fluorescence
Ig	Immunoglobuline
IL (1 ; 2)	Intensity Level (expression relative d'une protéine)
IL (6 ; 8)	Interleukine
IP	Iodure de propidium
kDa	Unité de masse moléculaire des protéines
<i>L.</i>	<i>Lactococcus</i>
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
Log Xf	Cultivabilité maximale
LPO	Lactoperoxydase
Lt	Temps de latence
MALDI-TOF	Désorption-ionisation laser assistée par matrice – temps de vol
MF	Modifying Factor (expression différentielle d'une protéine)
MM	Milieu mixte

MPO	Myéloperoxydase
MW	Molecular Weight
pHe	pH extracellulaire
pHi	pH intracellulaire
pI	Point isoélectrique
pKa	Constante de dissociation de l'acide lactique
PM	Poids moléculaire d'une protéine
pmf	Proton Motive Force
PTFE	Poly-tétra-fluoroéthylène
QPS	Qualified Presumption of Safety
RIN	RNA Integrity Number
ROS	Reactive Oxygen Species
S.	<i>Streptococcus</i>
salA	Salivaricine A
salB	Salivaricine B
SDS	Sodium dodécylsulfate
SOD	Super Oxyde Dismutase
SSC	Side-angle light scatter
SSR	Suspended Substratum Reactor
SWS	Stimulated whole saliva
TCA	Acide trichloracétique
TNF	Tumor Necrosis Factor
UFC	Unités Formant Colonie
UWS	Unstimulated whole saliva
VSC	Volatil Sulfur Compound
μ	Taux de croissance
μm	Taux de croissance maximal

# Sommaire

<b>I. INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>II. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>5</b>
II.1 <i>S. SALIVARIUS</i> , UNE BACTÉRIE APPARTENANT A L'ÉCOSYSTÈME BUCCAL .....	5
II.1.1 <i>La bouche : un écosystème riche et complexe</i> .....	5
II.1.1.1 Les streptocoques buccaux et <i>S. salivarius</i> .....	6
II.1.1.2 Les niches écologiques buccales des streptocoques .....	7
II.1.2 <i>S. salivarius, un probiotique oral ?</i> .....	9
II.1.2.1 Modulation de la réponse inflammatoire des cellules hôtes .....	9
II.1.2.2 Adhésion aux muqueuses .....	10
II.1.2.3 Production de bactériocines par <i>S. salivarius</i> .....	11
II.1.2.4 Innocuité de <i>S. salivarius</i> démontrée avec quelques réserves .....	14
II.1.3 <i>Caractéristiques générales de S. salivarius</i> .....	15
II.1.3.1 Un métabolisme carboné homofermentaire .....	15
II.1.3.2 Autres exigences nutritionnelles .....	20
II.2 PARAMÈTRES ORAUX INFLUENÇANT LA CROISSANCE DES BACTÉRIES ORALES ET DE <i>S. SALIVARIUS</i> .....	21
II.2.1 <i>La salive</i> .....	21
II.2.1.1 Existence de différentes salives selon les glandes productrices .....	21
II.2.1.2 Composition de la salive .....	23
II.2.1.3 Les rôles physiologiques de la salive .....	25
II.2.1.4 Action antibactérienne de la salive .....	27
II.2.2 <i>Paramètres environnementaux influant sur les bactéries orales</i> .....	32
II.2.2.1 Température et humidité .....	32
II.2.2.2 pH .....	33
II.2.2.3 Oxygène et potentiel d'oxydoréduction .....	34
II.2.2.4 Apport de nutriments et carence nutritionnelle .....	37
II.3 SIMULATION DE L'ENVIRONNEMENT ORAL IN VITRO .....	43
II.3.1 <i>Modes de culture et bioréacteurs associés</i> .....	43
II.3.1.1 Cultures en batch .....	43
II.3.1.2 Biofilms buccaux .....	44
II.3.2 <i>Milieux de culture utilisés pour l'étude des bactéries orales</i> .....	47
II.3.2.1 Utilisation de la salive naturelle .....	48
II.3.2.2 Utilisation de milieux de culture synthétiques .....	49
II.3.2.3 Utilisation de salives artificielles .....	49
II.3.2.4 Complémentation des salives artificielles par des éléments nutritifs .....	52
II.3.3 <i>Les applications des salives artificielles et des bioréacteurs associés</i> .....	53
II.3.3.1 Application des salives artificielles à l'étude de différents écosystèmes microbiens de la bouche .....	53
II.3.3.2 Application des salives artificielles et des bioréacteurs associés pour des études physiologiques des microorganismes oraux .....	54
II.3.3.3 Applications des salives artificielles à l'étude in vitro de <i>S. salivarius</i> .....	56
II.4 SYNTHÈSE DES INFORMATIONS .....	56
<b>III. MATÉRIELS ET MÉTHODES .....</b>	<b>59</b>
III.1 MICROORGANISMES ET PRECULTURES .....	59
III.2 MILIEUX « SALIVE ARTIFICIELLE » ET « SALIVE ARTIFICIELLE COMPLÉMENTÉE » .....	59
III.3 CONDUITE DES FERMENTATIONS .....	61
III.3.1 <i>Fermentations en batch</i> .....	61
III.3.1.1 Equipements utilisés .....	61
III.3.1.2 Suivi des fermentations .....	62

III.3.1.3 Plans d'expériences .....	62
III.3.2 Fermentations continues .....	63
III.3.2.1 Equipements utilisés.....	63
III.3.2.2 Déroulement des fermentations continues.....	64
III.3.2.3 Suivi des fermentations .....	65
III.4 ANALYSES EFFECTUEES A L'ECHELLE DE LA POPULATION .....	66
III.4.1 Analyse de la cultivabilité .....	66
III.4.2 Analyse des constituants du milieu par HPLC .....	66
III.4.3 Analyse de l'activité bactériocine .....	67
III.4.3.1 Principe de la méthode.....	67
III.4.3.2 Mise en œuvre.....	67
III.5 ANALYSES EFFECTUEES A L'ECHELLE DE LA CELLULE INDIVIDUELLE PAR CYTOMETRIE EN FLUX.....	68
III.5.1 Mesures de viabilité et de mortalité cellulaire.....	68
III.5.2 Mesure de dépolarisation membranaire .....	69
III.5.3 Mesure de vitalité cellulaire.....	69
III.5.4 Mesure du pH intracellulaire .....	69
III.5.5 Analyse de la fluorescence par cytométrie en flux.....	71
III.6 ANALYSE DU PROTEOME CYTOPLASMIQUE .....	73
III.6.1 Récolte et stabilisation des cellules.....	73
III.6.2 Extraction et purification des protéines.....	73
III.6.3 Première dimension de l'électrophorèse 2D .....	74
III.6.4 Deuxième dimension de l'électrophorèse 2D.....	74
III.6.5 Acquisition et analyse d'images.....	75
III.6.6 Identification des protéines par spectrométrie de masse MALDI-TOF.....	77
III.7 ANALYSE DU TRANSCRIPTOME .....	79
III.7.1 Extraction et vérification de la qualité des ARN.....	80
III.7.1.1 Extraction des ARN .....	80
III.7.1.2 Elimination de l'ADN résiduel et purification de l'ARN.....	81
III.7.1.3 Vérification de la qualité des ARN .....	81
III.7.2 Puces à ADN .....	83
III.7.2.1 Design des puces de type Agilent .....	84
III.7.2.2 Préparation de l'ADNc .....	85
III.7.2.3 Marquage de l'ADNc.....	86
III.7.2.4 Hybridation et scanner .....	87
III.7.2.5 Analyse statistique.....	88
III.7.3 PCR quantitative .....	88
III.7.3.1 Test des oligonucléotides et des concentrations d'ADN .....	89
III.7.3.2 Q-PCR des ADN complémentaires .....	91
<b>IV. RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>93</b>
IV.1 CREATION D'UNE SALIVE ARTIFICIELLE ET ETUDE DU COMPORTEMENT DE <i>STREPTOCOCCUS SALIVARIUS</i> K12 DANS CE MILIEU .....	93
IV.1.1 Contexte et objectifs de l'étude .....	93
IV.1.2 Caractérisation de la croissance et de la maintenance de <i>Streptococcus salivarius</i> dans une salive artificielle .....	94
IV.1.2.1 Résumé.....	94
IV.1.2.2 Publication.....	94
IV.1.3 Impact du milieu sur l'activité bactériocine de <i>S. salivarius</i> K12 .....	106
IV.1.3.1 Contexte et objectif de l'étude.....	106
IV.1.3.2 Méthodes et résultats .....	106
IV.1.3.3 Discussion et conclusion.....	107
IV.1.4 Conclusion sur l'adaptation de <i>S. salivarius</i> K12 au milieu salive artificielle .....	108

IV.2 EFFET DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX SUR LE COMPORTEMENT DE <i>S. SALIVARIUS</i> K12 CULTIVE EN SALIVE ARTIFICIELLE COMPLEMENTEE .....	111
IV.2.1 Contexte et objectifs de l'étude .....	111
IV.2.2 Les enzymes salivaires et l'air expiré affectent la croissance et l'état physiologique de <i>Streptococcus salivarius</i> dans une salive artificielle complétementée .....	112
IV.2.2.1 Résumé .....	112
IV.2.2.2 Publication .....	112
IV.2.3 Effet de l'ajout de saccharose sur la croissance et l'état physiologique de <i>S. salivarius</i> K12 en milieu salive artificielle complétementée .....	119
IV.2.3.1 Contexte et objectif de l'étude .....	119
IV.2.3.2 Méthodes et résultats .....	119
IV.2.3.3 Discussion et conclusion .....	121
IV.2.4 Conclusion sur l'effet des facteurs environnementaux sur <i>S. salivarius</i> K12 .....	122
IV.3 ETUDE EN CULTURE CONTINUE DE LA DYNAMIQUE BUCCALE SUR <i>S. SALIVARIUS</i> K12 .....	123
IV.3.1 Contexte et objectifs de l'étude .....	123
IV.3.2 Réponses de <i>S. salivarius</i> aux conditions dynamiques buccales lors de cultures continues .....	124
IV.3.2.1 Résumé .....	124
IV.3.2.2 Publication .....	124
IV.3.3 Conclusion sur l'effet de la dynamique buccale simulée en bioréacteur sur <i>S. salivarius</i> K12 .....	152
<b>V. CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>153</b>
<b>VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>159</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>181</b>



# I. Introduction

« Bien que mes dents soient bien entretenues, je trouvais entre elles une petite matière blanche, semblable à de la farine humide. J'en prélevais un peu et la diluais dans l'eau de pluie pour la voir au microscope. Le nombre des animaux qui peuplent les dents de l'homme est si important que je crois qu'il excède la population du royaume ».

Antonie van Leeuwenhoek (1684)

Voici la première description des bactéries buccales, proposée en 1684 par Antonie van Leeuwenhoek, illustre précurseur de la microbiologie et de la biologie cellulaire. Si cette découverte est très ancienne, ce n'est qu'au milieu du XX<sup>ème</sup> siècle que des recherches ont débuté sur la microflore buccale. Dans les années 1940-1950, les travaux concluent que la flore buccale est majoritairement commensale. Puis dans les années 1950-1960, certains microorganismes endogènes sont désignés comme agents étiologiques des caries et des maladies parodontales, et certaines espèces sont particulièrement ciblées (*Streptococcus mutans* et *Actinomyces* sp). Les recherches en microbiologie orale se focalisent alors sur ces bactéries et leur métabolisme, en lien avec leur action pathogène sur l'hôte. Plus récemment (à partir des années 1980), l'effet protecteur de la flore commensale orale au sein de la cavité buccale commence à être étudié. Certaines de ces bactéries sont même décrites comme des « probiotiques oraux ». Parmi elles, des lactobacilles (notamment *Lactobacillus casei*) et des bifidobactéries (en particulier *Bifidobacterium lactis*) ont été identifiés, ainsi que l'espèce *Streptococcus salivarius*. Cependant, même si plusieurs publications indiquent que cette espèce démontre des effets bénéfiques pour l'hôte, très peu d'études portent sur son métabolisme et sa croissance dans l'environnement buccal. Sa capacité d'adaptation à ce milieu, et donc son action probiotique potentielle, en dérivent pourtant directement.

Cet environnement buccal se caractérise par un milieu liquide (la salive) en renouvellement constant à cause de la déglutition, la présence de composés antimicrobiens (notamment des protéines salivaires) et un potentiel redox variable lié à l'oxygénation de la cavité buccale par la respiration de l'hôte... conditions pas toujours favorables à la croissance ou à la maintenance d'un microorganisme.

Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse est de comprendre comment la bactérie lactique commensale *Streptococcus salivarius* s'adapte à l'environnement buccal, en étudiant l'effet de certains paramètres susceptibles d'influer sur la croissance bactérienne. Les effets de ces facteurs



seront étudiés séparément puis ensembles, dans des conditions de culture proches de celles rencontrées dans la bouche, de façon à se rapprocher progressivement des conditions physiologiques rencontrées chez l'hôte.

Ce manuscrit est structuré en quatre chapitres couvrant respectivement une revue bibliographique, une description des matériels et méthodes utilisés, une présentation des résultats obtenus lors de ce travail suivie d'une conclusion générale et de perspectives.

La revue bibliographique est composée de trois parties. Après avoir présenté, dans une première partie, l'état des connaissances sur la bactérie buccale *S. salivarius* en lien avec ses propriétés métaboliques et probiotiques, la seconde partie s'intéresse à l'impact de l'environnement buccal sur les bactéries orales, et plus particulièrement sur *S. salivarius*. Dans cette section, les effets des composants salivaires, des paramètres physico-chimiques buccaux et de la disponibilité des nutriments sont étudiés. La dernière partie décrit les différents systèmes artificiels développés pour mimer les conditions orales, ainsi que leurs principales applications. Elle intègre notamment les travaux réalisés en biofilms et en cultures continues.

L'ensemble des matériels et méthodes utilisés dans ce travail sont exposés dans le second chapitre de ce manuscrit. Sont notamment décrits : la création des milieux de culture, les conditions de fermentation, et les méthodes de caractérisation de l'état physiologique employées dans cette étude, au niveau des populations et des cellules, ainsi qu'au niveau moléculaire (protéomique et transcriptomique).

Les résultats sont présentés et discutés au troisième chapitre, organisé en trois parties. La première s'intéresse à la mise au point d'une salive artificielle complémentée comme milieu d'étude *in vitro* de *S. salivarius* et à l'étude de son comportement dans ce milieu, en comparaison avec un milieu de référence. Dans la deuxième partie, les effets sur *S. salivarius* de plusieurs enzymes présentes dans la salive (amylase, lysozyme et peroxidase) ainsi que de l'aération du milieu de culture par un gaz simulant la composition de l'air expiré ont été déterminés. S'appuyant sur les résultats obtenus précédemment, la troisième partie a pour objectif de comprendre la dynamique microbienne dans des conditions proches de celles de la cavité buccale. Dans ce but, des cultures planctoniques en mode continu, mimant les flux salivaires et l'apport discontinu de nutriments, ont été réalisées. L'analyse de l'état physiologique bactérien ainsi qu'une approche transcriptomique ont notamment permis de comprendre les mécanismes mis en place par *S. salivarius* pour s'adapter au renouvellement de la salive et aux périodes de carence nutritionnelle.

Une conclusion générale récapitule les résultats marquants de cette étude. Le manuscrit se conclut enfin par une présentation des principales perspectives envisagées pour la poursuite de ces travaux.



## II. Synthèse bibliographique

### II.1 *S. salivarius*, une bactérie appartenant à l'écosystème buccal

#### II.1.1 La bouche : un écosystème riche et complexe

Plus de 600 espèces différentes de bactéries peuplent la bouche humaine, dont une grande partie n'est pas cultivable (Aas et al. 2005). Les principaux genres de bactéries retrouvés dans la cavité orale sont présentés dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Liste des principales bactéries peuplant la cavité orale, adaptée de Boy-Lefevre (1993) et Chardin (2006)

Genre bactérien	Gram	Morphologie	Motilité	Anaérobiose	Catalase
<i>Porphyromonas</i>	-	Co-Ba	-	+	-
<i>Prevotella</i>	-	Co-Ba	-	+	-
<i>Bacteroides</i>	-	Co-Ba	-	+	-
<i>Fusobacterium</i>	-	Ba	-	+	-
<i>Leptotrichia</i>	-	Ba	-	+	±
<i>Selenomonas</i>	-	Ba	+	+	-
<i>Centipeda</i>	-	Ba	+	+	-
<i>Haemophilus</i>	-	Co-Ba	-	±	±
<i>Actinobacillus</i>	-	Co-Ba	-	±	+
<i>Cardiobacterium</i>	-	Co-Ba	-	±	-
<i>Eikenella</i>	-	Ba	-	±	+
<i>Klebsiella</i>	-	Ba	-	±	+
<i>Campylobacter</i>	-	Ba	+	±	±
<i>Pseudomonas</i>	-	Co-Ba	+	-	+
<i>Neisseria</i>	-	Co	-	±	+
<i>Veillonella</i>	-	Co	±	-	±
<i>Actinomyces</i>	+	Ba	-	±	±
<i>Lactobacillus</i>	+	Ba	-	±	-
<i>Propionibacterium</i>	+	Ba	-	+	±
<i>Rothia</i>	+	Ba	-	±	±
<i>Bacillus</i>	+	Ba	-	±	+
<i>Bifidobacterium</i>	+	Ba	-	+	-
<i>Eubacterium</i>	+	Ba	±	+	-
<i>Enterococcus</i>	+	Co	-	±	-
<i>Micrococcus</i>	+	Co	-	-	+
<i>Staphylococcus</i>	+	Co	-	±	+
<i>Streptococcus</i>	+	Co	-	±	-
<i>Peptococcus</i>	+	Co	-	+	±
<i>Peptostreptococcus</i>	+	Co	-	+	-

S'ajoutent à cette liste les spirochètes, les mycoplasmes et les levures (Boy-Lefevre and Robert 1993; Chardin 2006). Grâce à cette diversité, la microflore orale exerce une pression vis-à-vis des bactéries indésirables ou pathogènes, notamment *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, qui sont donc absentes de l'écosystème buccal (Russell and Melville 1978).

Dans la bouche, cette population microbienne se répartit sur différents sites oraux où elle s'implante à des niveaux de concentration variable. Chez les adultes, on dénombre environ  $1.10^8$  bactéries/mg de plaque dentaire et 100 bactéries/cellule épithéliale sur le dos de la langue (Gibbons and Houte 1975). La concentration bactérienne dans la salive varie, selon les auteurs, entre  $4,3.10^6$  et  $5,5.10^9$  bactéries/mL (INSERM 1999; Tappuni and Challacombe 1993; Liljemark and Bloomquist 1996; Russell and Melville 1978). Ainsi, le nombre total de bactéries dans la bouche peut être estimé entre  $1.10^8$  et  $1.10^{12}$  bactéries.

#### ***II.1.1.1 Les streptocoques buccaux et S. salivarius***

Au sein de l'écosystème buccal, les streptocoques sont prépondérants. Premiers colonisateurs de la bouche, dès deux jours après la naissance, ils sont également le groupe bactérien le plus représenté numériquement dans la cavité orale puisqu'ils représentent plus de 20% de la flore buccale (Tappuni and Challacombe 1993; Chardin 2006).

Les streptocoques oraux sont divisés en 4 groupes : salivarius (*S. salivarius*, *S. thermophilus*, *S. vestibularis*), mutans (*S. mutans*, *S. sobrinus*), anginosus (*S. anginosus*, *S. intermedius*...) et mitis (*S. gordonii*, *S. mitis*, *S. oralis*, *S. sanguinis*...). Ce sont des cocci ovoïdes ou sphériques, immobiles et asporulés, à Gram positif, dont le diamètre est compris entre 0,5 et 2  $\mu\text{m}$ . Groupés en diplocoques ou en chaînettes de longueur variable (2 à plus de 50 coques), ils sont anaérobies-aérobies facultatifs (Carlsson 1971b; Prescott et al. 2003). Les espèces les plus présentes dans la bouche sont *S. salivarius*, *S. mitis* et *S. oralis* qui, à elles trois, représentent 83% des streptocoques identifiés (Figure 1) (Tappuni and Challacombe 1993).

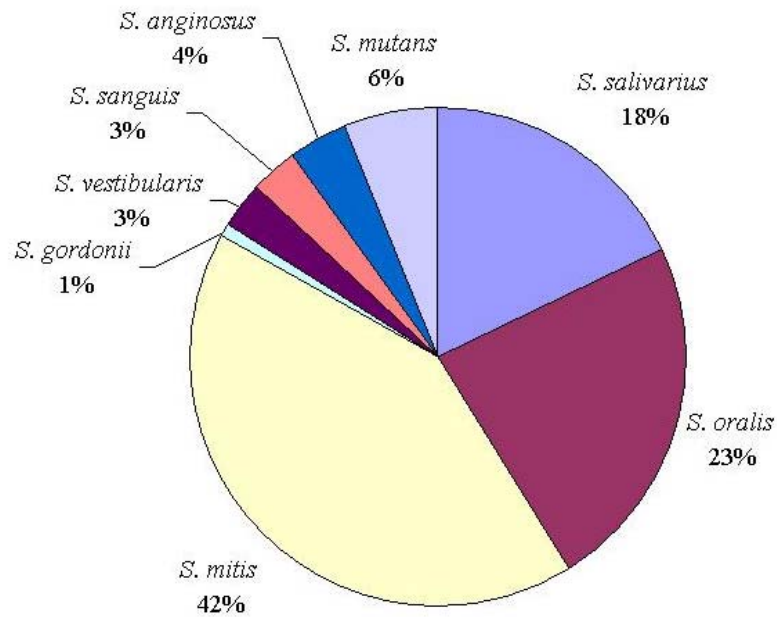


Figure 1 : Répartition des streptocoques dans la cavité buccale selon l'espèce, d'après Tappuni et al. (1993)

Cette prédominance du genre *Streptococcus* s'explique tout d'abord par leur pouvoir d'inhibition sur d'autres microorganismes, grâce à la production d'acides organiques, d' $H_2O_2$  et de bactériocines (Russell and Melville 1978). Leur taux de croissance très compétitif (Carlsson 1971a) et la diversité des niches écologiques buccales qu'ils occupent sont également des atouts majeurs.

### **II.1.1.2 Les niches écologiques buccales des streptocoques**

Le genre *Streptococcus* est présent sur toutes les surfaces buccales, avec des spécificités selon les espèces (Figure 2). *S. salivarius* est majoritairement présent dans la salive (environ  $1-4 \cdot 10^7$  UFC/mL) (Weerkamp and McBride 1980; Russell and Melville 1978), sur les muqueuses, le dos de la langue (Figure 2, Tableau 2) mais aussi dans le pharynx (Frandsen et al. 1991) ou encore dans le tube digestif.

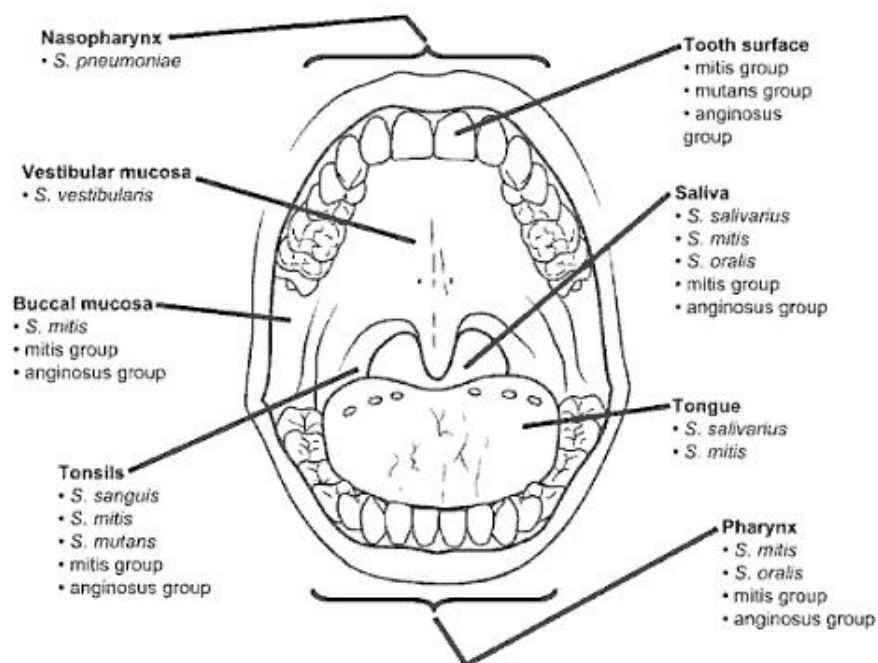


Figure 2 : Colonisation des sites buccaux par les streptocoques, d'après (Schachtele et al. 2007)

Tableau 2 : Proportion de *S. salivarius* chez l'adulte en fonction des sites buccaux considérés

	Salive	Langue	Joues ou muqueuses	Dents	Références
Proportion de <i>S. salivarius</i> par rapport à la flore totale cultivable	6-24 %	8-12 %	0 %	0,2-2 %	(Van Houte et al. 1970; Socransky and Manganiello 1971)
Proportion de <i>S. salivarius</i> par rapport aux Streptocoques totaux	35-48 %	54-56 %	10,7%	0,5- 2,0 %	(Gibbons et al. 1964; Krasse 1954)

Le dos de la langue est composé de cryptes et de vallées situées entre les papilles. C'est la niche écologique buccale possédant la plus grande diversité bactérienne (Liljemark and Bloomquist 1996). La présence préférentielle de *S. salivarius* sur la langue est liée à ses capacités d'adhésion sur ce site, ce qui lui vaut d'être le premier pionnier de la cavité buccale (Russell and Melville 1978). Les dents permettent la colonisation des surfaces minéralisées et des crevasses gingivales associées par *S. mutans* et *S. sanguis*, dont l'adhésion est très efficace sur ces surfaces (Gibbons and Houte 1975; Van Houte et al. 1970). La plaque dentaire est le biofilm buccal le plus étudié puisque, de sa composition microbienne, dépend l'apparition de caries (Liljemark and Bloomquist 1996; Boy-Lefevre and Robert 1993).

Si *S. mutans*, agent étiologique principal des caries ou *S. pyogenes*, responsable d'affections du tractus respiratoire sont néfastes pour l'hôte, d'autres streptocoques peuvent présenter une activité

bénéfique. C'est le cas de *S. salivarius*, dont certaines souches sont considérées comme probiotique oral.

### **II.1.2 *S. salivarius*, un probiotique oral ?**

Certaines souches de *S. salivarius* démontrent des effets bénéfiques au sein de la cavité orale. C'est le cas de la souche *S. salivarius*, K12, présente naturellement chez 2% des adultes (Horz et al. 2007), qui est commercialisée sous forme lyophilisée en tant que probiotique oral, depuis 2001, dans plusieurs pays (Amérique du Nord, Australie, Nouvelle-Zélande). La notion de probiotique se définit habituellement comme « des microorganismes vivants, qui, lorsqu'ils sont consommés en quantité suffisante dans l'alimentation, ont un effet bénéfique sur la santé de l'hôte » (FAO 2001). Un probiotique oral ne rentre donc pas tout à fait dans cette définition, mais le fait qu'il contribue à la santé de la bouche de l'hôte permet de l'assimiler à cette description.

Les propriétés probiotiques de *S. salivarius* reposent sur plusieurs caractéristiques détaillées ci-dessous : colonisation de la même niche écologique que les bactéries responsables de la mauvaise haleine, inhibition d'autres microorganismes grâce à la production de bactériocines et effet sur la réponse inflammatoire de l'hôte.

#### ***II.1.2.1 Modulation de la réponse inflammatoire des cellules hôtes***

La réponse inflammatoire chez l'homme, se caractérise comme l'ensemble des phénomènes réactionnels déclenchés, dans un organisme vivant, par une agression exogène (physique, chimique, infectieuse), ou endogène (trophique, conflit immunitaire). Cette inflammation est contrôlée par la voie de signalisation NF- $\kappa$ B, et est notamment caractérisée par la production de chimiokines pro-inflammatoire (Interleukine IL6, IL8, TNF, Gro $\alpha$ ). Les chimiokines constituent un groupe de petites protéines sécrétées de 8 à 12 kDa, qui sont capables d'induire le chimiotactisme de nombreuses cellules immunitaires (neutrophiles, monocytes, lymphocytes, éosinophiles, granulocytes) et par conséquent de les recruter vers le site de l'infection (Campbell and Reece 2001).

Des études récentes réalisées *in vitro* décrivent une diminution jusqu'à 86 % de la sécrétion de l'interleukine 8 (IL8) par des cellules humaines épithéliales de bronches, mises en présence de *S. salivarius* K12 pendant 48 h (Cosseau et al. 2008). De plus, la voie NF- $\kappa$ B est affectée par *S. salivarius* K12, qui atténue de 56% la sécrétion du facteur Gro $\alpha$  (Cosseau et al. 2008). Un autre travail conduit sur trois souches de *S. salivarius* (K12, RS1 et ST3), confirme l'inhibition de l'IL8 mais aussi de l'interleukine 6 et du facteur TNF- $\alpha$  produits par des cellules eucaryotes



(Guglielmetti et al. 2010). De façon plus systématique, Kaci et al. (2011) ont montré une réduction de la voie inflammatoire NF- $\kappa$ B de cellules épithéliales intestinales humaines, en présence du surnageant de 32 souches de *S. salivarius*. Ces mêmes auteurs ont identifiés dans le surnageant bactérien un peptide actif (<3 kDa), capable de diminuer la sécrétion de l'IL8, et qui pourrait être à l'origine de l'effet anti-inflammatoire de *S. salivarius*. Ces résultats sont toutefois contredits par les travaux de Mostefaoui et al. (2004). Lors d'essais réalisés *in vitro* sur une muqueuse orale humaine reconstituée en contact avec la souche de *S. salivarius* ATCC25975, ces auteurs observent une activation des gènes de l'IL6, de l'IL8 et du TNF- $\alpha$ , contribuant ainsi à une réponse pro-inflammatoire.

Finalement, ces résultats montrent que *S. salivarius* est capable de moduler la réponse inflammatoire des cellules humaines, en favorisant un effet anti-inflammatoire pour la majorité des souches testées.

### ***II.1.2.2 Adhésion aux muqueuses***

Nous avons vu précédemment que la localisation de *S. salivarius* dans la bouche est liée à ses capacités d'adhésion (II.1.1.2). Celles-ci sont dues à de nombreuses adhésines, de spécificité et d'affinité diverses. Les adhésines sont des protéines présentes à la surface des cellules, responsables d'interactions de type Van der Waals entre les bactéries et l'hôte (Nobbs et al. 2009). Ces protéines sont soit, ancrées à la paroi grâce à des motifs spécifiques (Levesque et al. 2004), soit imbriquées dans la membrane plasmique, soit fixées à la surface cellulaire par des liaisons non covalentes (Whittaker et al. 1996; Nobbs et al. 2009). *S. salivarius* possède plusieurs adhésines dont quelques-unes ont été identifiées (Nobbs et al. 2009). Les adhésines les plus connues de *S. salivarius* sont les pili, fimbriae ou fibrils. Elles favorisent la co-agrégation entre *S. salivarius* et certaines bactéries (*Veillonella* spp. et *Fusobacterium nucleatum* notamment) (Handley et al. 1984; Handley et al. 1987), la formation de biofilms (Weerkamp et al. 1986; Levesque et al. 2004), et la liaison de *S. salivarius* à certains composés salivaires ( $\alpha$ -amylase, glycoprotéines extra parotidiques) (Weerkamp et al. 1987; Handley et al. 1987). Les fibrils seraient également des sites de sécrétion de protéines à travers la membrane des streptocoques (Rosch et al. 2007). En plus des adhésines, les streptocoques oraux et *S. salivarius* produisent des exopolysaccharides (EPS) qui participent à la formation de biofilms buccaux, (Colby and Russell 1997; Marsh and Martin 2009) et à l'adhésion de *S. salivarius* aux cellules épithéliales (Gibbons et al. 1972).

Ainsi, de nombreux mécanismes permettent l'adhésion de *S. salivarius* à ses surfaces de prédilection, ce qui lui permet d'entrer en compétition avec d'autres bactéries, notamment celles responsables de l'halitose, localisées également sur le dos de la langue (Haraszthy et al. 2007; Kazor et al. 2003).

### ***II.1.2.3 Production de bactériocines par S. salivarius***

Les bactériocines sont de petits peptides antimicrobiens qui sont produits par des bactéries Gram positives et présentent une activité inhibitrice contre cette même catégorie de microorganismes. La salivaricine appartient à la classe I des bactériocines, les lantibiotiques, dont la production est fréquente chez les streptocoques (Jack et al. 1995; Ross et al. 1993). Ce sont des polypeptides polycycliques, de 19 à 50 acides aminés, synthétisés au niveau des ribosomes. Ils subissent des modifications post-traductionnelles, consistant en la fixation de l'acide aminé lanthionine ou méthyl-lanthionine sur le peptide, d'où leur nom de lantibiotiques (Horz et al. 2007; Wescombe et al. 2006a; Tagg et al. 2004).

Environ 60% des souches de *S. salivarius* présentent une activité bactériocine (Wescombe et al. 2006a). Différents variants de salivaricine (9, A1-A2, B, G32) sont produits selon les souches considérées (Wescombe et al. 2011; Wescombe et al. 2009; Hyink et al. 2007). La production de salivaricine A (Sala) est plus fréquente que celle de salivaricine B (SalB) (Hyink et al. 2007) et certaines souches sont capables de produire plusieurs salivaricines. C'est le cas de *S. salivarius* K12, dont le pouvoir inhibiteur provient de l'action combinée de Sala et SalB (Hyink et al. 2007; Burton et al. 2006a).

La salivaricine A est produite à partir d'un pro-peptide de 48 acides aminés, codé par le gène *sala* (Ross et al. 1993). Sa finition post-transcriptionnelle et sa régulation sont assurées par un système d'opéron *salBCTXYKR* (Horz et al. 2007; Ross et al. 1993). Sala peut être synthétisée par divers streptocoques oraux, dont *S. pyogenes*, *S. salivarius* et *S. mutans* mais avec des variants différents. En particulier, la souche *S. salivarius* K12 produit le variant salA2, un peptide de 2,37 Da, chargé positivement, avec un pHi de 5,9 (Ross et al. 1993; Wescombe et al. 2006b). La salivaricine B de *S. salivarius* K12 est un peptide de 2,74 Da, codé par un cluster de 8 gènes (*sboB: sboK, sboR, sboA, sboM, sboT, sboF, sboE, sboG*) (Hyink et al. 2007; Tagg et al. 2004). Les gènes de ces deux salivaricines sont localisés sur un mégaplasmide de 190 kb (Hyink et al. 2007; Wescombe et al. 2006a). Ceci favorise la transmission de ces fonctions à d'autres souches endogènes de *S. salivarius* dans la bouche (Dierksen et al. 2007; Wescombe et al. 2006a). Ces deux bactériocines sont auto-inductibles (Wescombe et al. 2009; Burton et al. 2006a), et servent

de molécules signales à leur propre expression génique (Upton et al. 2001). Ainsi, le taux de salivaricine dans la salive est accru après administration de *S. salivarius* K12, par stimulation des bactéries préexistantes (Burton et al. 2006a).

Si le mode d'action de ces salivaricines n'a pas été étudié spécifiquement, les caractères bactéricides de SalB et bactériostatiques de Sal A ont été décrits (Burton et al. 2006a; Tagg et al. 2004). Leurs modes d'action peuvent être assimilés à ceux des autres lantibiotiques: formation de pores à travers la membrane plasmique, induction de l'autolyse, inhibition des synthèses biologiques (paroi, ADN, ARN, protéines et polysaccharides) (Jack et al. 1995). Plusieurs études recensent la sensibilité des espèces bactériennes buccales et pathogènes, aux bactériocines produites par *S. salivarius* et en particulier par la souche K12 (Tableau 3).

Tableau 3 : Activité inhibitrice de salA2 et salB produites par *S. salivarius* K12, d'après (Tagg et al. 2004)

Espèces bactériennes	Nombre de souches testées	Nombre de souches sensibles à SalA2	Nombre de souches sensibles à SalB
<i>Streptococcus pyogenes</i>	15	15	15
<i>Streptococcus agalactiae</i>	5	0	2
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	4	1	2
<i>Streptococcus sanguis</i>	6	0	6
<i>Streptococcus mutans</i>	6	0	0
<i>Streptococcus sobrinus</i>	4	0	3
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	0	0
<i>Escherichia coli</i>	2	0	0

Ce tableau montre que de nombreuses souches de streptocoques sont inhibées, à l'exception de l'espèce *S. mutans*. En revanche, des espèces plus éloignées, telles que *Staphylococcus aureus* ou *Escherichia coli* ne sont pas sensibles aux bactériocines de *S. salivarius* K12. L'espèce la plus sensible est *S. pyogenes*, pathogène reconnu des voies respiratoires, et sensible à toutes les salivaricines (9, A, B, G32) détectées chez *S. salivarius* (Wescombe et al. 2009). Des études complémentaires montrent également l'inhibition de certaines bactéries Gram positives responsables de la mauvaise haleine (*Eubacterium saburreum*, *Streptococcus anginosus*, *Micrococcus luteus*) par les salivaricines de la souche K12 (Burton et al. 2005). En revanche, les bactéries Gram négatives testées (*Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*) ne sont pas affectées, en lien avec le spectre d'activité restreint de ces bactériocines.

Cette production de salivaricine est modulée par les conditions d'environnement, notamment par la composition du milieu de culture. Chez *S. salivarius* K12, la production est plus efficace en milieu solide additionné de saccharose, qu'en culture liquide, ou qu'en présence de glucose ou lactose (Hyink et al. 2007; Ross et al. 1993). Sachant cela, il est intéressant de remarquer qu'à ce jour, aucune publication ne confirme la production de bactériocines par des streptocoques dans la cavité orale, dans laquelle le « milieu » est la salive.

S'appuyant sur cette activité bactériocine, de nombreuses études ont porté sur l'administration de *S. salivarius* à l'hôte et sur l'étude de sa colonisation dans la cavité buccale. L'objectif de ces travaux vise à valider l'utilisation de la souche *S. salivarius* K12, (commercialisé par BLIS Technologies, NZ) pour réduire l'halitose, et les affections dues à *Streptococcus pyogenes* (Tagg et al. 2009; Burton et al. 2006a; Tagg 2004). Ainsi, les travaux de Burton et al. (2006a) concluent à une réduction de la mauvaise haleine, par la succion de pastilles de *S. salivarius* K12 lyophilisés, chez des personnes atteintes d'halitose. En effet, chez 85% des sujets traités, une diminution de plus de 100ppb des composés soufrés volatils émis est observée après une semaine de traitement (Burton et al. 2006a). Cet effet fait d'ailleurs l'objet d'un brevet de traitement de l'halitose (Tagg et al. 2009). De plus, Tagg (2004) montre que les enfants possédant naturellement une souche de *S. salivarius* productrice de salA2 et SalB présentent moins de pharyngites à streptocoques que les autres. L'ensemble de ces travaux indique que l'administration de pastilles de *S. salivarius* K12 engendre une colonisation transitoire de la cavité buccale et du pharynx pendant la durée du traitement, mais pas chez tous les sujets (Horz et al. 2007). Ainsi, l'administration de *S. salivarius* K12 sous forme de poudre à des enfants sensibles aux otites révèle un taux de colonisation de 33% (Power et al. 2008). La succion régulière de pastilles pendant trois jours permet la colonisation avec la souche K12 de 13 sujets sur 14 (Burton et al. 2006a). Cependant, un mois après le traitement, seulement 4/14 sujets possèdent encore la souche K12 dans leur cavité orale (Burton et al. 2006a). Horz et al. (2007) indiquent également un retour à la concentration initiale de cette souche dans la bouche, 11 jours après la fin du traitement avec *S. salivarius* K12. Des essais avec d'autres souches de *S. salivarius* (*S. salivarius* 20P3 et *S. salivarius* 5) confirment qu'une colonisation de la bouche se produit lorsque ces souches sont administrées sous forme de poudre de lait lyophilisé contenant ces souches. Ces auteurs montrent également que si 83% des sujets sont colonisés après 2 à 9 jours de traitement, une chute de la colonisation intervient à la fin du traitement (14 à 21% de sujets colonisés 7 jours après l'arrêt du traitement) (Dierksen et al. 2007).

Finalement, d'après les informations précédentes, même si leur persistance en bouche est faible après l'arrêt des traitements, l'effet positif de certaines souches de *S. salivarius* est admis et leur intérêt probiotique validé. Cependant, leur utilisation comme probiotiques oraux suppose une parfaite innocuité de ces souches, qui doit donc être démontrée.

#### ***II.1.2.4 Innocuité de S. salivarius démontrée avec quelques réserves***

Il convient tout d'abord de rappeler la proche parenté génétique entre *S. salivarius* et *S. thermophilus*, bactérie lactique largement utilisée en industrie laitière. Leurs ARN16s présentent plus de 99% de similitude (Bentley et al. 1991), leurs gènes *sodA* respectifs sont identiques à 90% (Poyart et al. 1998), et l'hybridation ADN-ADN entre ces 2 espèces est supérieure à 60% (Farrow and Collins 1984). Elles ont d'ailleurs été considérées comme deux sous-espèces d'une même espèce dans les années 1990. Selon Delorme et al. (2010), il est probable que *S. thermophilus* et *S. salivarius* aient un ancêtre commun.

Plusieurs études démontrent, en outre, l'innocuité de la souche *S. salivarius* K12 en s'appuyant sur :

- ✓ Son faible niveau d'antibiorésistance et l'absence des facteurs de virulence habituellement présents chez *S. pyogenes* (Burton et al. 2006b) ;
- ✓ La stabilité d'expression phénotypique et métabolique de la souche quelque soit son origine (humaine, laboratoire, commerciale) (Burton et al. 2006b) ;
- ✓ Les résultats positifs des études de toxicité et de génotoxicité à court et long termes sur des rongeurs (Burton et al. 2010) ;
- ✓ L'absence d'effets secondaires sur l'homme (questionnaires et tests sanguins) après ingestion quotidienne pendant 28 jours (tests en double aveugle contre placebo) et son absence de réactions délétères pour l'hôte (pas de retour de la pharmacovigilance quant à des effets secondaires chez les personnes ayant consommé la souche K12) (Burton et al. 2011).

Cependant, certaines souches de l'espèce *S. salivarius* peuvent présenter un caractère pathogène. Ainsi, des cas de bactériémie, de pneumonie et d'endocardite à *S. salivarius* ont été décrits, principalement chez des patients immunodéprimés (Corredoira et al. 2005). Deux autres études montrent des cas uniques de méningite à *S. salivarius* à la suite d'une intervention chirurgicale (Conte et al. 2006; Carley 1992). A cause de ces caractéristiques, l'espèce *S. salivarius* est

classée comme pathogène opportuniste, et appartient en Europe au groupe 2 de risque microbiologique, avec *S. pyogenes*. L'espèce n'a pas non plus obtenu le statut QPS (qualified presumption of safety) délivré par l'EFSA, pourtant obtenu par *S. thermophilus* (EFSA 2004). En conséquence, les études d'innocuité doivent être réalisées pour chaque souche susceptible de présenter un intérêt probiotique, d'autant que les analyses génomiques ne permettent pas de distinguer les souches commensales des souches déjà associées à des cas de pathologie (Delorme et al. 2007). Dans ce contexte, il est bon de rappeler que l'innocuité de *S. salivarius* K12 est démontrée (Burton et al. 2011; Burton et al. 2010; Burton et al. 2006b), et que cette espèce connaît un engouement grandissant, du fait de ses propriétés probiotiques (et de son intérêt commerciale !) (Guglielmetti et al. 2010).

### **II.1.3 Caractéristiques générales de *S. salivarius***

#### ***II.1.3.1 Un métabolisme carboné homofermentaire***

*S. salivarius*, comme tous les streptocoques, ne synthétise ni catalase, ni nitrate réductase, ni cytochrome oxydase. Il n'est donc pas capable d'assimiler l'oxygène comme accepteur final d'électrons. Par conséquent, la synthèse d'ATP est assurée par la dégradation du glucose en acide lactique, selon la voie homofermentaire de la glycolyse (Atlan et al. 2008). Les connaissances sur le métabolisme de *S. salivarius* étant encore limitées à ce jour, elles seront complétées, lorsque nécessaire, avec celles concernant *S. thermophilus* et d'autres streptocoques buccaux.

##### *II.1.3.1.1 Les sucres utilisés par *S. salivarius* et leurs modes de transport*

Les sucres fermentés en acide lactique par les bactéries lactiques peuvent être des monosaccharides (glucose, galactose,..) ou des disaccharides (lactose, saccharose, ...). Alors que *S. thermophilus* ne fermente que le lactose, saccharose, glucose, et quelques souches le galactose et le fructose (Hols et al. 2005), *S. salivarius* peut dégrader de nombreux glucides (Tableau 4). Cette variété de sucres assimilables lui confère un avantage compétitif au sein de la cavité buccale.

Tableau 4 : Principaux sucres utilisés par *S. salivarius* et enzymes permettant leur transport (adapté de Burton et al. (2006b) et d'analyses *in silico* de *S. salivarius* JIM8777 (E. Guédon) et *S. salivarius* SK126 (données NCBI))

Sucres :	Mode de transport supposé chez <i>S. salivarius</i>	Souches dont l'analyse <i>in silico</i> révèle l'enzyme responsable du transport
D-Galactose	Perméase	JIM8777 / SK126
D-Glucose	PEP-PTS	JIM8777
D-Fructose	PEP-PTS / (perméase)	JIM8777/ (SK126)
D-Mannose	PEP-PTS	JIM8777
N-acetylglucosamine	Nd	Nd
Arbutine	Nd	Nd
Salicin	Nd	Nd
D-Cellobiose	Nd	Nd
D-Maltose	Perméase	JIM8777/ SK126
D-Lactose	Perméase	JIM8777
D-Saccharose	PEP-PTS	JIM8777/ SK126
D-Trehalose	PEP-PTS	JIM8777/ SK126
Inuline	Nd	nd

Nd : non déterminé à ce jour

En amont des réactions de dégradation de ces sucres, leur transport est assuré, soit par le système perméase, soit par le système phosphotransférase phosphoénol-pyruvate dépendant (PEP-PTS) (Tableau 4 et Figure 3). Le système perméase ATP-dépendant (Figure 3A) correspond à un transport actif des sucres par symport avec un proton. Le sucre est internalisé sous sa forme native, ce qui conduit à l'utilisation d'un ATP pour le phosphoryler (Konings et al. 1997). Le système phosphotransférase phosphoénol-pyruvate dépendant (PEP-PTS) (Figure 3B) permet simultanément le transport du substrat et sa phosphorylation en consommant une molécule de PEP. C'est donc un système énergétiquement plus favorable que le système perméase (Postma et al. 1993).

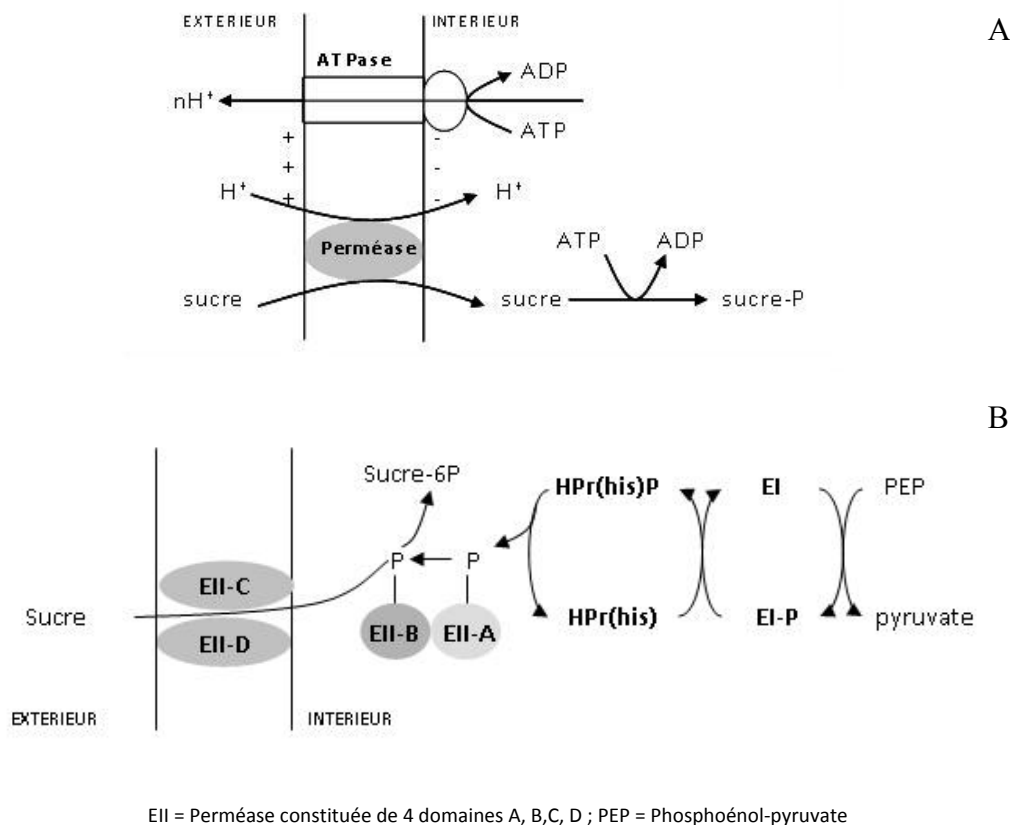


Figure 3 : Systèmes phosphotransfèreuse phosphoénol-pyruvate (A) et perméase (B) dépendants et pour le transport des sucres chez les bactéries lactiques (Atlan et al. 2008)

Chez *S. salivarius*, le lactose entre dans la cellule grâce à une perméase spécifique (LacS) qui présente 95% d'homologie avec celle de *S. thermophilus* (Lessard et al. 2003). Cette caractéristique confirme la parenté étroite entre ces deux espèces. En effet, les autres streptocoques oraux utilisent plutôt le système PEP-PTS (Marsh and Martin 2009; Chen et al. 2002).

### II.1.3.1.2 Voies de production d'énergie

A l'intérieur de la cellule, *S. salivarius* réalise une fermentation homolactique qui conduit à la conversion des sucres en pyruvate par la glycolyse (Figure 4), et s'accompagne de la production de deux molécules d'ATP par monosaccharide. A partir du pyruvate, *S. salivarius* produit du lactate sous l'action d'une lactate déshydrogénase, permettant ainsi la ré-oxydation du NADH (Hols et al. 2005).



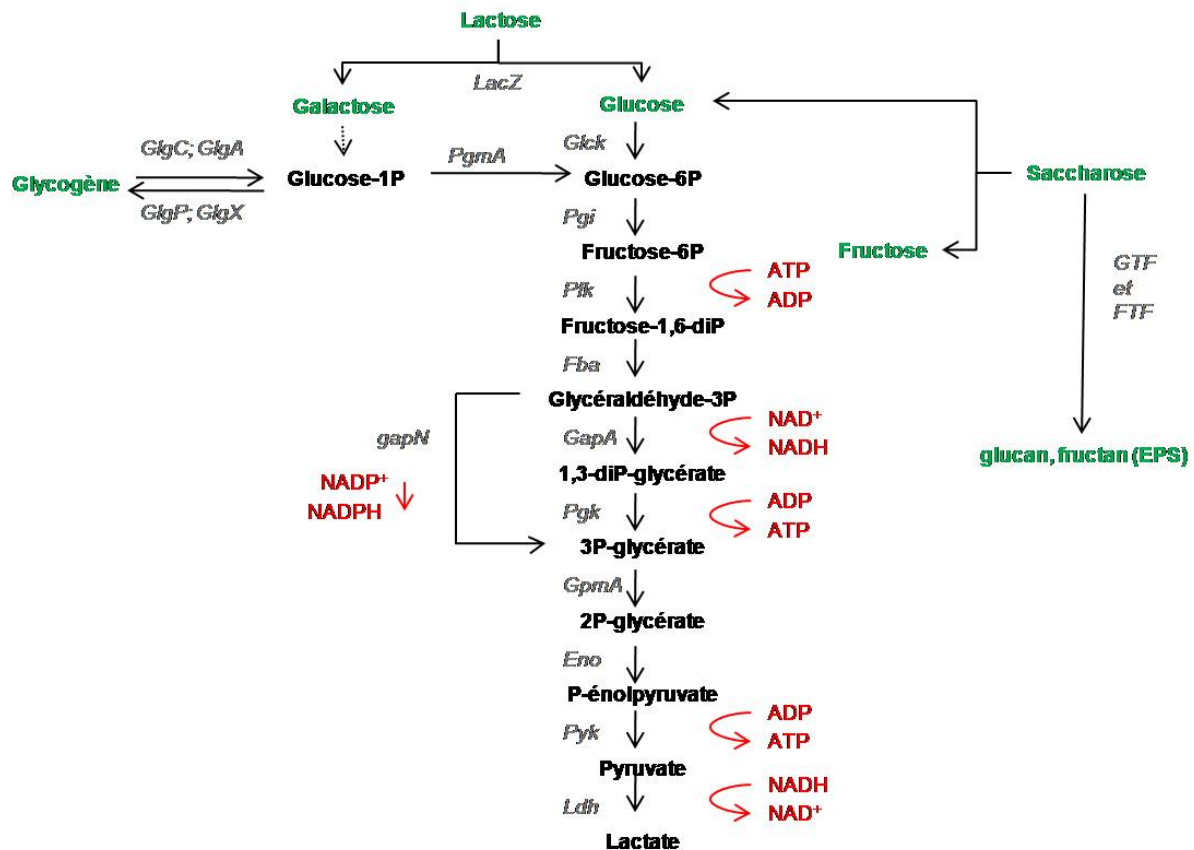


Figure 4 : Métabolisme carboné central probable chez *S. salivarius* (adapté de Wilson et al. (2010); Hols et al. (2005) ; Marsh and Martin (2009)).

*Eno* : 2-phosphoglycérate deshydratase énoïase ; *Fba* : Fructose diphosphate aldolase ;, *FRF* : Fructosyltransférase ; *GapA* : Glycéraldéhyde-3-P déshydrogénase ; *GapN* : NADP-dépendante glycéraldéhyde-3-P-déshydrogénase ; *Glk* : Glucokinase ; *GlgA* : Glycogène synthase ; *GlgC* : Glucose-1-phosphate adényl transférase ; *GlgP* : Glycogène phosphorylase ; *GlgX* : Enzyme de décrochage du glycogène de type isoamylase ; *Ldh* : Lactate déshydrogénase ; *GmpA* : Phosphoglycérate mutase ; *GTF* : Glucosyltransférase ; *Pfk* : 6-Phosphofruktokinase ; *Pgma* : Phosphoglucomutase ; *Pgi* : Glucose-6-phosphate isomérase ; *Pgk* : Phosphoglycérate kinase ; *Pyk* : Pyruvate kinase.

Les connaissances relatives à l'assimilation des sucres par *S. salivarius* diffèrent selon le substrat considéré. Concernant le lactose, *S. salivarius* possède un opéron lactose constitué des gènes *lacS* et *lacZ* codant respectivement pour le transport du lactose et son clivage en glucose et galactose par une  $\beta$ -galactosidase interne (Vaillancourt et al. 2002). Une version extracellulaire de cette enzyme existe également chez *S. salivarius* (Hamilton and Lo 1978). Le glucose entre directement dans la voie de la glycolyse, tandis que le galactose est converti en glucose-1-P par la voie de Leloir avant de rejoindre la voie de la glycolyse (Lessard et al. 2003; Chen et al. 2002). Ceci est permis par la présence d'un opéron galactose, constitué de trois gènes (*galK*, galactokinase; *galT*, galactose-1-P uridylyltransférase; *galE*, UDP-glucose 4-épimérase) et complété par deux autres gènes (*galM*, galactose mutarotase et *galR*, régulateur transcriptionnel)

(Vaillancourt et al. 2002). *S. salivarius* est également capable d'assimiler le saccharose, avec un temps de génération très court, similaire à celui observé sur glucose (21 min) (Chassy et al. 1976). L'utilisation du saccharose est permise par l'action des enzymes glucosyltransférases (Gtf) et fructosyltransférases (Ftf) (Marsh and Martin 2009), qui clivent le saccharose. Ces enzymes extracellulaires ou ancrées à la paroi chez *S. salivarius* (Townsend-Lawman and Bleiweis 1991) permettent conjointement la libération de monosaccharides qui rejoignent la voie de la glycolyse et la formation d'exopolysaccharides (EPS).

En conditions physiologiques favorables (absence d'inhibition), l'acide lactique produit à l'intérieur de la cellule est excrété à l'extérieur par un système de symport, en couplage avec l'excrétion de protons. Le gradient de pH qui en découle est compensé par l'entrée de protons au niveau de l'ATPase, permettant ainsi la formation d'ATP supplémentaire (Figure 5).

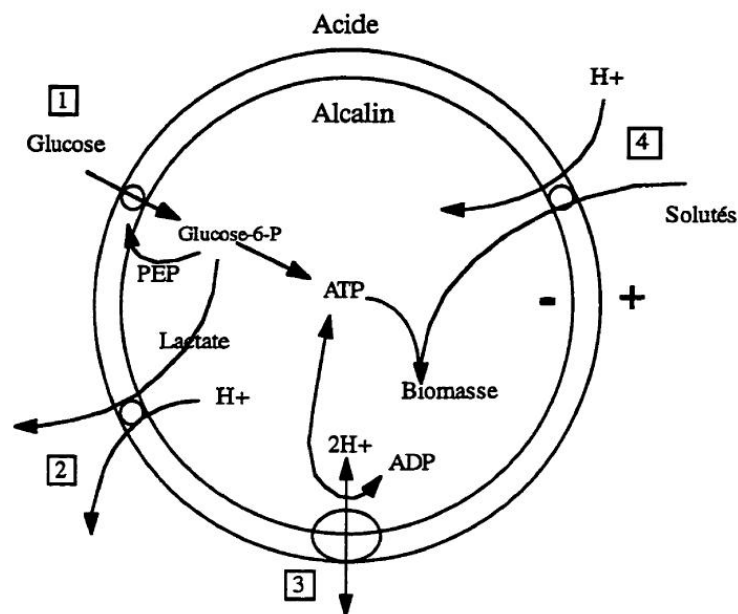


Figure 5 : Schéma des processus de génération et de consommation d'énergie au cours du métabolisme des lactocoques, d'après Konings and Otto (1983). 1) Synthèse de l'ATP par glycolyse; 2) Couplage du flux d'acide lactique au flux de protons; 3) Système ATPase, couplage de la sortie de proton avec consommation d'ATP ou de l'entrée de proton avec production d'ATP; 4) Couplage du flux de solutés au flux de protons

### II.1.3.1.3 Phénomènes d'inhibition par l'acide lactique

Chez les bactéries lactiques, l'accumulation d'acide lactique dans la cellule génère une inhibition de la croissance bactérienne et de sa propre production. Au fur et à mesure de l'avancement de la fermentation et de l'accroissement de la concentration en acide lactique, la diminution du gradient d'acide lactique et, par conséquent, du gradient de pH associé, oblige progressivement la cellule à utiliser ses réserves d'énergie (ATP) pour excréter des protons à l'aide du système ATPase. Ce mécanisme lui permet de limiter l'acidification de son cytoplasme et de maintenir

son pH intracellulaire à une valeur compatible avec sa physiologie (Atlan et al. 2008; Ten Brink et al. 1985). La quantité d'énergie disponible pour d'autres fonctions, comme l'élaboration des constituants cellulaires et la mise en œuvre de certains métabolismes et transports actifs, diminue peu à peu, pour finalement s'annuler. L'effet inhibiteur de l'acide lactique est dépendant du niveau de dissociation de la molécule (équilibre entre les formes acide lactique non dissocié  $\text{CH}_3\text{-HCOH-COOH}$  et lactate dissocié  $\text{CH}_3\text{-HCOH-COO}^-$ ) (Amrane and Prigent 1999). Par exemple, chez *Lb. helveticus*, le taux de croissance s'annule pour une concentration de 10 g/L d'acide lactique, mais 60 g/L de lactate (Schepers et al. 2002). Les concentrations inhibitrices en acide lactique et lactate diffèrent selon les bactéries et les conditions de culture. Ainsi, une concentration de 5 g/L d'acide lactique divise le taux de croissance de *Lb. rhamnosus* par 2 (Gonçalves et al. 1997), tandis que 36 g/L sont nécessaires chez *Lactobacillus delbrueckii* (Mercade et al. 2003). Pour *S. thermophilus* cultivé en milieu riche et à pH régulé, la concentration critique en acide lactique est de 16,7 g/L (Acuña et al. 1994), valeur relativement faible comparée aux autres bactéries lactiques dont la concentration critique est plutôt de l'ordre de 60 g/L (Béal et al. 2008).

### ***II.1.3.2 Autres exigences nutritionnelles***

Comme toutes les bactéries lactiques, *S. salivarius* n'est pas capable d'assimiler l'azote minéral, et démontre une activité protéolytique peu développée (Atlan et al. 2008). Sa croissance nécessite donc l'apport de sources d'azote facilement assimilables, comme des acides aminés libres ou des petits peptides. Cependant, peu d'études portent sur les exigences en sources d'azote de *S. salivarius*. Il est toutefois possible que cette espèce ne soit pas très exigeante, si l'on considère sa proximité avec *S. thermophilus*, qui est une espèce de bactérie lactique peu exigeante en acides aminés (Atlan et al. 2008). Ainsi, le milieu minimal pour sa croissance, déterminé par la technique dite d'omissions, ne contient que six acides aminés (cystéine, méthionine, isoleucine, leucine, valine et glutamate) (Letort and Juillard 2001). Une autre étude montre que la croissance de *S. salivarius* nécessite sept acides aminés (méthionine, isoleucine, leucine, glutamate, arginine, lysine et tyrosine) (Carlsson 1971b). Dans la bouche, une source d'azote possible pour *S. salivarius* est l'urée, molécule présente dans la salive (Chen et al. 2000; Carlsson 1971b). Une étude a en effet montré qu'un mutant uréase négatif de la souche *S. salivarius* 57.I n'est pas capable de croître avec l'urée comme seule source d'azote, contrairement à la souche sauvage. Ce travail souligne l'importance des voies métaboliques dépendantes de l'uréase dans l'utilisation de l'urée comme nutriments, sans toutefois les identifier.

Les besoins en minéraux de *S. salivarius* n'ont pas été étudiés, mais il est, là encore, possible de se baser sur les études concernant *S. thermophilus*. Ainsi, des études de croissance par omissions montrent que le magnésium est le seul ion indispensable et que le calcium est un stimulateur de la croissance de cette espèce (Letort and Juillard 2001). Le magnésium est en effet impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires essentielles (division, stabilisation des acides nucléiques, synthèse de la paroi, métabolisme du pyruvate, hydrolyse de peptides, activité ATPase, survie, etc.) (Boyaval 1989; Webb 1953, 1951). Pour sa part, le calcium participerait à la liaison de la protéase de paroi avec la paroi cellulaire et à la stabilité de cette activité protéasique (Boyaval 1989). Le calcium, en combinaison avec le magnésium stimule l'activité de l'ATPase membranaire (Boyaval 1989). En revanche, selon Letort and Juillard (2001), la présence de Fe, Zn, Co, Cu et Mn n'est pas indispensable à la croissance de *S. thermophilus*.

Certaines vitamines sont indispensables à la croissance des bactéries lactiques (LAB). Les milieux de culture élaborés pour la croissance de *S. salivarius* contiennent cinq vitamines particulières : l'acide nicotinique, la biotine, la thiamine, la riboflavine et l'acide pantothénique (Carlsson 1971b). Cette composition a été enrichie par l'acide ascorbique et de la pyridoxamine pour la croissance de *S. thermophilus* (Letort and Juillard 2001).

## **II.2 Paramètres oraux influençant la croissance des bactéries orales et de *S. salivarius***

*S. salivarius* est une bactérie orale dont la croissance dépend de l'environnement buccal, notamment de l'action de la salive sur les bactéries, mais également des paramètres physico-chimiques et de la disponibilité en nutriments au sein de la bouche.

### **II.2.1 La salive**

#### ***II.2.1.1 Existence de différentes salives selon les glandes productrices***

Il existe deux fluides principaux dans la bouche : la salive et le fluide gingival. La salive est un liquide incolore, visqueux, qui baigne la cavité buccale. Elle résulte des sécrétions des glandes salivaires principales (Figure 6): parotides, sous-maxillaires, sublinguales, et des glandes salivaires mineures disséminées dans les muqueuses labiales, palatines et linguales (Whelton 2004). Le fluide gingival est défini comme un liquide provenant et composé d'éléments du sérum, qui suinte dans la bouche par le sillon gingivo-dentaire (Marsh and Martin 2009). Le flux

de fluide gingival est très lent (20  $\mu\text{L}/\text{h}$ ) chez les individus sains mais augmente de 150% en cas de gingivites (Marsh and Martin 2009).

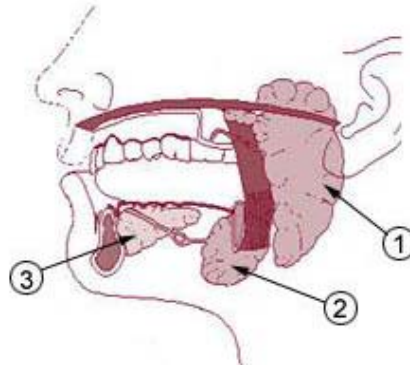


Figure 6 : Principales glandes salivaires : parotides (1) ; sous-maxillaires (2) et sublinguales (3), d'après [http://fr.wikipedia.org/wiki/Glande\\_salivaire](http://fr.wikipedia.org/wiki/Glande_salivaire)

La composition des « salives » diffère selon les glandes productrices. Cependant, la dénomination « salive » représente usuellement le fluide formé à partir de l'ensemble des sécrétions de chaque glande. On différencie principalement deux types de salive: la salive stimulée et la salive non stimulée (Marsh and Martin 2009).

La salive non stimulée résulte du mélange des sécrétions présentes dans la bouche en absence de stimuli exogènes. Le flux moyen est d'environ 0,3 mL/min (Almståhl and Wikström 2003). Elle est généralement composée de sécrétions de la parotide (25%), des glandes sous-maxillaires (60%), des glandes sublinguales (7-8%), et des glandes mineures (7-8%) (Whelton 2004; Edgar 1990).

La salive stimulée en revanche est produite en réponse à une stimulation, principalement gustative, masticatoire, ou olfactive (Dawes 2004). Le flux moyen de la salive stimulée varie entre 0,6 et 2,3 mL/min selon le stimuli (Engelen et al. 2007), mais atteint en moyenne 2 mL/min (Almståhl and Wikström 2003). Cette salive provient de sécrétions parotidiennes (50%), sous-maxillaires (35%), sublinguales (7-8%), et des glandes mineures (7-8%) (Whelton 2004; Edgar 1990).

Ainsi, au cours de la journée, le flux salivaire varie en fonction du type de salive, tandis que pendant la nuit, ce flux, souvent considéré comme nul est égal à 0,05 mL/min (Dawes 1974). Cette alternance circadienne des flux conduit à la production quotidienne de 0,5 à 1,5 L de salive

(Del Vigna de Almeida et al. 2008; Whelton 2004; Humphrey and Williamson 2001). Le flux salivaire varie également en fonction de l'âge, du degré d'hydratation, de la position du corps, de l'exposition à la lumière, du tabagisme, de stimulations antérieures, des rythmes circadiens et circannuels, des médicaments ingérés (Whelton 2004; Rantonen 2003).

### *II.2.1.2 Composition de la salive*

La salive est un liquide aqueux (99,4 à 99,5% d'eau), d'une densité moyenne de 1,004. Le résidu sec se partage entre 0,18 à 0,22% de substances minérales et 0,30 à 0,34% de substances organiques (Parret et al. 1982). Le Tableau 5 recense les principaux composés salivaires. Les protéines, dont la concentration est comprise entre 0,8 (Lee et al. 2007) et 7,0 (Agha-Hosseini et al. 2006), représentent l'essentiel des composés organiques (Tabak and Bowen 1989). Il est cependant difficile d'estimer leur taux précis, qui varie selon la technique de mesure utilisée (Jenzano et al. 1986). Ces protéines sont constituées principalement des glycoprotéines (en particulier de mucines) qui représentent environ 40% des protéines, et des enzymes salivaires (Tableau 5). Les principales enzymes salivaires sont l' $\alpha$ -amylase, le lysozyme, et la peroxydase. Les autres constituants organiques présents dans la salive sont les immunoglobulines, l'urée, le glucose, l'ammoniac, les lipides et acides aminés. La salive contient également de nombreux minéraux. Les anions principaux sont les bicarbonates, les chlorures et les phosphates. Les cations principaux sont le sodium, le potassium, le calcium et le magnésium. Concernant les minéraux, la composition des salives non stimulée et stimulée est proche, à l'exception des ions sodium et bicarbonates, dont les concentrations sont plus élevées en salive stimulée. Il a de plus été montré que la vue et l'odeur de nourriture augmente la sécrétion de  $\text{HCO}_3^-$  (Brown et al. 1995).

Tableau 5 : Composition principale moyenne de la salive non stimulée (et stimulée si différente)

Constituants	Salive non stimulée / Stimulée si différence	Valeurs extrêmes	Références
Na <sup>+</sup>	4,9 mM / 22 mM	2-32	(Chitra and Shyamala Devi 2008; Carda et al. 2006; Odman 2005; Almståhl and Wikström 2003; Gandara et al. 1987; Dawes 1981)
K <sup>+</sup>	21,1 mM	6-40	(Chitra and Shyamala Devi 2008; Carda et al. 2006; Odman 2005; Almståhl and Wikström 2003; Gandara et al. 1987; Dawes 1981)
Ca <sup>2+</sup>	1,63 mM	1,3-1,8	(Odman 2005; Almståhl and Wikström 2003; Larsen et al. 1999; Dawes 1981, 1972)
Cl <sup>-</sup>	21, 4 mM	5-40	(Carda et al. 2006; Odman 2005; Dawes 1981, 1972)
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	4,3mM / 17,3 mM	3-6 / 14-30	(Odman 2005; Fenoll-Palomares et al. 2004; Almståhl and Wikström 2003; Bardow et al. 2000; Dawes 1981)
Pi	5,78 mM	3-6	(Odman 2005; Almståhl and Wikström 2003; Bardow et al. 2000; Dawes 1981, 1972)
Mg <sup>2+</sup>	0,37 mM	10 µM-0,4 mM	(Odman 2005; Leibovitz et al. 2003; Dawes 1984, 1981)
I <sup>-</sup>	2-22 µmol		(Whelton 2004)
F <sup>-</sup>	0,2-2,8 µmol		(Whelton 2004)
Protéines totales	2,5 g/L	1-7	(Chitra and Shyamala Devi 2008; Carda et al. 2006; Agha-Hosseini et al. 2006; Odman 2005; Whelton 2004; Dawes 1984, 1981)
amylase	300 U/mL	10-500	(Engelen et al. 2007; Lee et al. 2007; Enberg et al. 2001; Gandara et al. 1987)
cystatine	0,08 mg/mL		(Ito et al. 2008)
lysosyme	200-1603 U/mL	200-1600	(Chitra and Shyamala Devi 2008; Lee et al. 2007; Gandara et al. 1987)
peroxydase	0,8 mU/mL	0,7-0,9	(Lahteenmaki et al. 2000; Tenovuo et al. 1987)
Lactoferrine	1 µg/mL	1,0-1,3	(Lee et al. 2007)
Mucines totales	0,9 g/L	0,70-0,95	(Dziemianczyk et al. 2005; Whelton 2004; Rayment et al. 2001)
proteines riches en proline	0-80 mg/L		(Whelton 2004)
stathérine	16-147 mg/L		(Whelton 2004)
IgAs	0,08 g/L	0,05-0,26	(Koh et al. 2004; Lahteenmaki et al. 2000; Nahir et al. 1987; Gandara et al. 1987)
IgG	0,02 g/L	0,01-0,03	(Lahteenmaki et al. 2000; Gandara et al. 1987)
IgM	<0,01g/L		(Lahteenmaki et al. 2000; Tenovuo et al. 1987)
Urée	0,2 g/L	0,17-0,41	(Carda et al. 2006; Whelton 2004; Dawes 1972)
glucose	0,01 g/L	0-0,22	(Carda et al. 2006; Agha-Hosseini et al. 2006)
Lipides	20 mg/L		(Whelton 2004)
Acides aminés	40 mg/L		(Whelton 2004)
ammoniac	0,6-7 mM		(Whelton 2004)

### *II.2.1.3 Les rôles physiologiques de la salive*

On peut diviser les fonctions de la salive en trois grands groupes (Figure 7). La fonction alimentaire contribue à la digestion (mastication et déglutition) et à la perception des aliments. Ceci est rendu possible par l'initiation de la digestion enzymatique, notamment par la mise en contact des aliments avec l'amylase salivaire qui va cliver l'amidon, la lipase linguale et des protéases salivaires. De plus, l'anhydrase carbonique, métalloprotéine de zinc, est également appelé gustine (Thatcher et al. 1998). Elle serait en effet responsable de la croissance des bourgeons gustatifs, puisque sa diminution entraîne une perte de goût (Shatzman and Henkin 1981).

Certains composants jouent également un rôle dans la protection des dents. Lorsque le pH est acide, les "phosphates de calcium" de l'hydroxyapatite (trame minérale de l'émail) sont arrachés et libérés dans la salive. Grâce aux stathérines et aux protéines riches en proline, qui se lient aux ions calcium, ces "phosphates de calcium" ne précipitent pas et peuvent être redéposés sur l'émail lors de la reminéralisation (Tenovuo 2004; Levine 1993b). Le fluor salivaire inhibe la déminéralisation (augmente la résistance de l'émail à l'acide) et accroît la reminéralisation (Shellis and Duckworth 1994).

Enfin, certains constituants de la salive interagissent avec les microorganismes de la bouche, ce qui explique que la salive soit considérée comme un fluide antibactérien. Cette fonction sera détaillée dans la partie suivante.



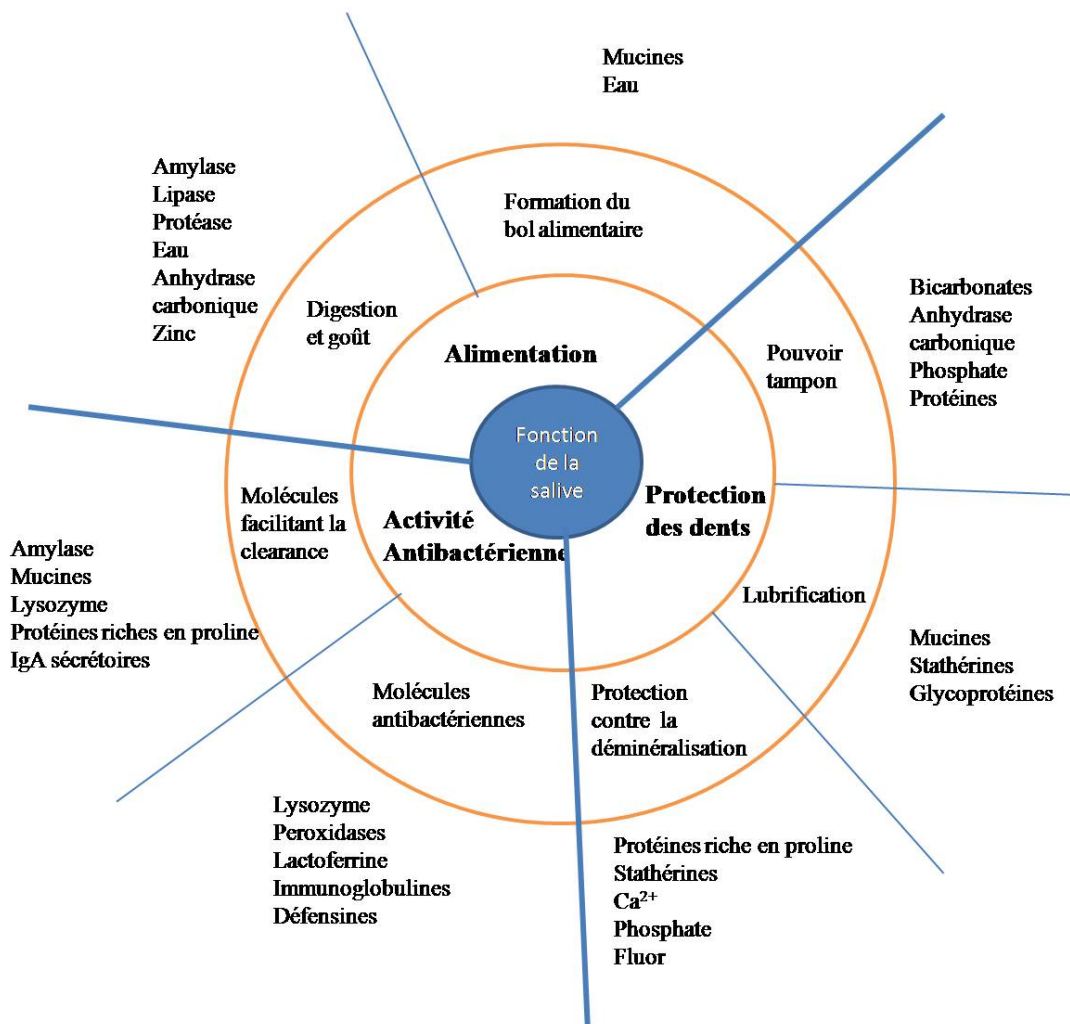


Figure 7 : Principales fonctions de la salive et principales molécules salivaires impliquées dans ces fonctions, adapté de Humphrey and Williamson (2001); Mandel (1987); Tenovuo et al. (1987); Edgar (1990)

D'après la Figure 7, trois caractères principaux sont attribués aux composés salivaires (Levine 1993b):

**Caractère multifonctionnel** (rôle d'un constituant dans plusieurs fonctions). Grâce à leur pouvoir de viscosité, les mucines sont ainsi les principales actrices de la lubrification buccale et de la formation du bol alimentaire (Tabak 1995; Tabak et al. 1982). Elles démontrent également une action antibactérienne en agglutinant les bactéries, mais à contrario, favorisent leur croissance en étant une source de nutriments (Van der Hoeven and Camp 1991; Tabak et al. 1982; Levine et al. 1978).

**Caractère redondant** (même fonction réalisée par différentes molécules). Ainsi, il existe plusieurs systèmes tampon dans la salive. Le principal est le système bicarbonates/CO<sub>2</sub> (Dawes

2004), qui implique une réaction enzymatique mettant en jeu l'anhydrase carbonique (Murakami and Sly 1987). Ce mécanisme est à l'origine d'une production accrue de bicarbonates dans la salive stimulée, ce qui permet de pallier à l'acidification provoquée par les repas. A titre mineur, le pouvoir tampon de la salive implique aussi le système phosphates ( $\text{HPO}_4^-$ ), en particulier sous la forme  $\text{H}_2\text{PO}_4$ , dont le Pka et donc la capacité tampon maximale se situe à pH 7,21 (Bardow et al. 2000). Enfin, la majorité des protéines salivaires ont un rôle tampon mineur, via leur capacité à lier le  $\text{CO}_2$  (Bardow et al. 2000). L'urée peut également influencer sur le pH salivaire via des phénomènes d'uréolyse (II.2.2.2) (Dawes 2004).

**Caractère contradictoire** (plusieurs fonctions à la fois protectives et délétères pour l'hôte). L'amylase interagit avec les streptocoques en favorisant leur clairance (Scannapieco et al. 1989). En revanche, son adsorption sur les dents (c'est un composé de la pellicule exogène acquise) promeut l'adhérence bactérienne sur ces surfaces minéralisées et contribue à fournir des nutriments aux microorganismes, via l'hydrolyse de l'amidon (Levine 1993a, 1993b).

Parmi les composés salivaires, nombreux sont ceux qui interagissent avec les microorganismes et permettent ainsi à la salive d'être un agent majeur de la santé buccale et un fluide reconnu comme antibactérien.

#### ***II.2.1.4 Action antibactérienne de la salive***

Le maintien de l'intégrité de la cavité buccale est assuré par un ensemble de mécanismes regroupés sous le terme d' « exclusion immune ». L'exclusion immune comporte une élimination mécanique des microorganismes, une inhibition physico-chimique par les sécrétions muqueuses et salivaires, et une neutralisation par des facteurs spécifiques (Chardin 2006).

##### ***II.2.1.4.1 Système de défense systémique***

L'exclusion immune spécifique est permise par les anticorps présents dans la salive. Cette dernière contient plusieurs types d'immunoglobulines, en particulier des IgAs, IgA, IgG, IgM (Chardin 2006). Les IgA, IgG et IgM sont d'origine sérique et proviennent du fluide gingival, ou sont diffusées à travers la muqueuse orale (Brandtzaeg 2007). Leur quantité dans la salive est extrêmement faible et leur spécificité dépend des stimulations préalables du système immunitaire général (Chardin 2006). Les rôles précis de ces immunoglobulines sériques dans la santé buccale sont encore méconnus. Néanmoins, l'IgG serait responsable de la neutralisation du virus de l'herpès dans la salive (Valimaa et al. 2002).

Les IgA sécrétoires (IgAs) sont secrétées dans les glandes salivaires, en réponse à une stimulation antigénique buccale (Brandtzaeg 2007). Elles sont spécifiques des antigènes présents dans la cavité buccale, ou plus largement, dans le tractus aéro-digestif (Chardin 2006). Il existe des IgAs spécifiques de *S. mitis*, *S. mutans* ou *S. salivarius* (Brandtzaeg 2007; Tenovuo 2004). La fonction principale des IgAs est de favoriser la clairance des bactéries en agissant comme une agglutinine. Elles participent également à la neutralisation des virus, toxines et enzymes bactériennes (Haukioja 2009).

#### II.2.1.4.2 Clairance et molécules agglutinantes

Le flux salivaire assure une élimination constante des déchets alimentaires et des bactéries non fixées sur un substrat ou un biofilm, ou agglomérées entre elles (Chardin 2006). Ce turn-over permanent via la déglutition et le renouvellement continu de salive est essentiel à l'équilibre buccal. Il permet d'éliminer régulièrement bactéries et cellules épithéliales et de limiter ainsi le développement de pathogènes (Mandel 1987). Plusieurs modèles ont été créés pour décrire cette clairance, le plus récent étant le modèle de Dawes (Dawes 2004). Ce dernier assimile la clairance buccale à l'action d'un siphon incomplet et prévoit une demi-vie de 2,2 min en cas de flux salivaire non stimulé (Dawes 2008, 2004).

L'élimination bactérienne est accrue par de nombreux composés salivaires (agglutinines, enzymes...), capables de s'agréger avec des bactéries orales et de faciliter ainsi leur expulsion de la bouche. Les agglutinines regroupent les glycoprotéines (dont la mucine et les immunoglobulines, principalement IgAs) ayant une capacité à former des agrégats avec les bactéries. Ainsi, 0,1 µg de l'agglutinine la plus efficace peut associer jusqu'à  $10^8$  cellules de *S. mutans* (Ericson and Rundegren 1983; Levine et al. 1978). La liaison entre la mucine et les streptocoques est induite par l'acide sialique et le N-acétylgalactose, deux molécules spécifiques de cette glycoprotéine (Marsh and Martin 2009; Tabak et al. 1982; Levine et al. 1978). L'agrégation bactérienne est accentuée par les liaisons possibles de la mucine de type MG1 avec d'autres molécules salivaires (amylases, protéines salivaires), formant ainsi des complexes bactériens de plus grande taille (Iontcheva et al. 1997).

Certaines enzymes peuvent s'agréger avec des bactéries. Dans le cas du lysozyme qui peut interagir avec *S. salivarius*, cette agrégation est provoquée par la formation d'une liaison entre la partie cationique du lysozyme et des composants anioniques de la surface bactérienne (Laible and Germaine 1982). L'amylase, en plus de son rôle digestif, peut également adhérer à certaines espèces de streptocoques dont *S. salivarius* (Kilian and Nyvad 1990; Douglas 1983). Ce

phénomène implique une liaison entre les pilis associés à la paroi et l'amylase, récemment démontrée chez *S. sanguinis* (Okahashi et al. 2011).

Si ces liaisons bactéries-molécules agglutinantes facilitent la clairance, elles peuvent aussi être favorables au maintien des microorganismes dans la cavité buccale. Par exemple, les streptocoques liés à l'amylase peuvent utiliser les substrats de l'amidon sans avoir à synthétiser leurs propres enzymes (Douglas et al. 1992). De plus, les molécules salivaires peuvent se lier aux dents, formant ainsi une pellicule exogène acquise, dont la présence facilite la colonisation bactérienne (Marsh and Martin 2009; Douglas et al. 1992).

#### II.2.1.4.3 Les molécules antibactériennes et leurs actions sur les bactéries buccales

La salive contient aussi des molécules ayant un potentiel antibactérien, notamment des protéines et des enzymes. De très nombreux peptides antibactériens (< 50 acides aminés) à large spectre (défensines, cathélicidines et histatines) sont impliqués dans des mécanismes de défense de l'hôte (Marsh and Martin 2009). Mais, les principales protéines antibactériennes salivaires étudiées sont le lysozyme, la peroxydase et la lactoferrine.

##### *II.2.1.4.3.1 La lactoferrine*

La lactoferrine est une glycoprotéine de 75 kDa présente dans la salive, qui a la capacité de se lier au fer ferrique  $Fe^{3+}$  (Marsh and Martin 2009). Cette protéine prive ainsi les microorganismes pathogènes aérobies de cet élément essentiel à leur croissance (Tenovuo 2004). Du fait de leur caractère anaérobie, le besoin en fer des bactéries lactiques est faible (Elli et al. 2000; Pandey et al. 1994). Il est donc raisonnable de penser que l'effet de la lactoferrine sur les bactéries lactiques est limité.

##### *II.2.1.4.3.2 Le lysozyme*

Le lysozyme est une protéine de 14 kD, composée de 129 acides aminés, dont l'activité antibactérienne est effective entre pH4 et pH10 (Davies et al. 1969). Ce potentiel inhibiteur a plusieurs explications et, quels que soient les mécanismes d'inhibition mis en jeu, une conformation intacte du lysozyme est indispensable (Masschalck and Michiels 2003).

En termes de mécanismes, le lysozyme dégrade le peptidoglycane, qui représente 90% de la paroi des cellules bactériennes Gram positives. Cette scission s'exerce sur la liaison glycosidique  $\beta$ -(1-4) entre l'acide N-acétyl-muramique et la N-acétyl-glucosamine, qui constitue la colonne vertébrale du peptidoglycane (Masschalck and Michiels 2003; Chung and Hancock 2000). Cette hydrolyse provoque la lyse cellulaire chez les bactéries Gram positives. Les bactéries Gram

négatives ne sont pas concernées car elles ne possèdent pas autant de peptidoglycane (Nash et al. 2006). Les fragments du peptidoglycane hydrolysé induiraient également une réponse inflammatoire (Majcherczyk et al. 1999).

D'autres études ont démontré une inhibition non enzymatique des bactéries Gram négatives et positives, notamment de certains streptocoques (*S. sanguis* et *S. faecalis*). L'effet bactéricide chez *S. faecalis* dépend de la conformation du lysozyme : 32% de survie avec un lysozyme inactivé contre 0,5% avec un lysozyme actif (Laible and Germaine 1982). Cette inhibition est due à une liaison électrostatique entre la surface bactérienne chargée négativement, et un motif cationique particulier du lysozyme (Ibrahim et al. 2001a; Ibrahim et al. 2001b). Ces mêmes auteurs suggèrent également que le lysozyme pourrait arracher de la cellule les cations  $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$  (contre-ions des phospholipides membranaires), ce qui perturberait la membrane et induirait la production d'autolysines. Ceci a été démontré chez *S. aureus* et *B. subtilis*, mais les mécanismes restent encore inconnus (Ibrahim et al. 1997).

L'action inhibitrice du lysozyme dépend des conditions. Une force ionique correspondant à 0.2 M de sels inhibe l'activité du lysozyme (Davies et al. 1969). L'ajout de 4% de sels dans un milieu MRS augmente la concentration minimale inhibitrice d'un facteur 500 chez certaines bactéries lactiques (*Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*) (Chung and Hancock 2000). La concentration minimale inhibitrice du lysozyme varie cependant de 12 U/mL pour *Lb. sakei* à plus de 1500 U/mL pour *Pediococcus acidilactici* (Chung and Hancock 2000). Chez *Staphylococcus aureus* en revanche, aucun effet sur la membrane plasmique n'est observé, même à 10 000 U/mL (Chung and Hancock 2000). L'ajout de certains ions spécifiques comme le  $Ca^{2+}$  (1 mM) (Ibrahim et al. 1997), le  $Mg^{2+}$  (0,01 mM) ou le  $K^+$  (à 0,2 mM) permet également de diminuer l'activité du lysozyme, notamment chez *S. mutans* (Wang and Germaine 1993). Ceci peut être dû à une rééquilibration de la membrane, puisque le lysozyme est capable d'arracher ces cations de la membrane cellulaire (Ibrahim et al. 1997).

Il est également possible que les bactéries souvent confrontées au lysozyme aient développé des stratégies de résistance. Une étude montre en effet une probable insensibilité des bactéries orales et notamment de *S. salivarius* à 50  $\mu$ g/mL de lysozyme (Gibbons et al. 1966). Ceci pourrait être expliqué par la production d'un peptidoglycane résistant aux muramidases via des acétylations spécifiques de l'acide N-acétyl-muramique et de la N-acétyl-glucosamine (Masschalck and Michiels 2003).

#### II.2.1.4.3.3 Le système peroxydase

Il existe deux types de peroxydases dans la salive humaine, la myéloperoxydase (MPO) et la peroxydase salivaire ou lactoperoxydase (LPO). Ces enzymes catalysent une réaction entre un halide ou un pseudohalide et le peroxyde d'hydrogène pour former de l'eau et l'élément chimique correspondant (Ihalin et al. 2006). Ainsi, le rôle premier de ces peroxydases est de protéger les tissus de l'hôte des effets délétères du peroxyde d'hydrogène (II.2.2.3) (Ihalin et al. 2006). Ce peroxyde d'hydrogène est généré dans la salive par des nombreux microorganismes, notamment des streptocoques (Garcia-Mendoza et al. 1993). Les systèmes Duox (NADPH oxydases) des glandes salivaires et certains leucocytes produisent également de l' $H_2O_2$ , mais plus faiblement (Geiszt et al. 2003). En raison de son instabilité, il est difficile d'estimer la concentration salivaire du  $H_2O_2$ , mais il semble que celle-ci soit comprise entre 0,03 et 13  $\mu M$ , et que le peroxyde d'hydrogène soit le composé limitant dans le système peroxydase (Pruitt et al. 1982). Pour réagir avec le peroxyde d'hydrogène, la MPO peut utiliser les ions  $Cl^-$ ,  $Br^-$ ,  $I^-$  et  $SCN^-$  comme substrat tandis que la peroxydase salivaire n'utilise que les ions  $Br^-$ ,  $I^-$  et  $SCN^-$ . Les produits de ces réactions sont :  $HOCl/OCl^-$ ,  $HOBr/OBr^-$ ,  $HOI/OI^-$  et  $HOSCN/OSCN^-$  (Davies et al. 2008). Dans la salive,  $SCN^-$  est le substrat le plus utilisé du fait de sa forte concentration (environ 1 mM) (Tenovuo and Makinen 1976), et de sa vitesse rapide de réaction avec la peroxydase (Furtmuller et al. 2002; Furtmuller et al. 1998).

L'oxydation de substrats par le système peroxydase libère des produits antimicrobiens (Ihalin et al. 2006). La sensibilité des microorganismes diffère cependant selon les espèces et les souches (Carlsson et al. 1983), les bactéries Gram négatives étant plus sensibles que les Gram positives. Les bactéries anaérobies sont également plus sensibles que les bactéries aérobies (Ihalin et al. 2006; Ihalin et al. 2001). Chez les streptocoques, le système peroxydase- $SCN^-$  a plusieurs effets antibactériens démontrés :

- ✓ Inhibition de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase ou de la phosphoglycérate kinase chez *S. mutans*, *sanguis*, *mitis* et *salivarius*, ralentissant l'utilisation des sucres (Mansson-Rahemtulla et al. 1983; Thomas et al. 1983; Carlsson et al. 1983). La présence de lysozyme augmente cet effet chez *S. mutans* (Lenander-Lumikari et al. 1992) ;
- ✓ Inhibition du transport du glucose chez *S. agalactiae* (Mickelson 1977) ;
- ✓ Oxydation des protéines cellulaires chez *S. agalactiae* (Mickelson 1979) ;

- ✓ Accroissement de la sensibilité à l'oxygène chez *S. salivarius* (Carlsson et al. 1983). L'activité NADH oxydase, qui protège contre l'oxygène est réduite par des concentrations d'OSCN<sup>-</sup> beaucoup plus faibles que chez d'autres streptocoques (Carlsson et al. 1983) ;
- ✓ Induction *in vitro* de l'inflammation de cellules endothéliales humaines, par l'activation de facteurs de transcription pro-inflammatoires potentiels (Wang et al. 2006) ;
- ✓ Inhibition *in vitro* de l'activité de plusieurs glucosyltransférases de *S. mutans* (action de l'enzyme LPO sans substrat) (Korpela et al. 2002).

Pour se défendre, les bactéries orales sont peut être capables de dégrader cette enzyme, comme cela a été démontré chez les murins. Dumas et al. (1987) montrent que 48% de la flore totale isolée de cavités buccales murines, et 94% des souches de *S. aureus* sont capables de dégrader la peroxydase salivaire. Bien que les mécanismes d'action *in vitro* des molécules antibactériennes orales soient connus, leur impact dans la cavité buccale n'a jamais été évalué, alors que leur importance dans le contrôle de la croissance des bactéries buccales semble primordiale (Tenovuo 2004).

Il est également important de noter que la peroxydase issue du raifort (HPR), majoritairement utilisée en recherche, n'est pas présente naturellement dans la bouche. Elle réagit cependant très lentement avec le SCN<sup>-</sup> et uniquement à un pH supérieur à 6,0 (Adak et al. 1997; Modi et al. 1991). Néanmoins, des études ont montré que la combinaison *in vitro* dans la salive de HPR avec de l'iode et de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> engendre une chute de la viabilité de *Fusobacterium nucleatum*, qui passe de 85% de viables (témoin) à 37% (Ihalin et al. 2003). Son action contre des pathogènes parodontaux en fait un possible agent antimicrobien.

## **II.2.2 Paramètres environnementaux influant sur les bactéries orales**

### ***II.2.2.1 Température et humidité***

La température de la bouche est relativement constante aux environs de 36,5-37°C (Sund-Levander et al. 2002; Heintze et al. 1986), ce qui autorise la croissance d'un grand nombre d'espèces bactériennes, dont *S. salivarius* (température optimum 37 °C) (Chassy et al. 1976). Cependant, des variations existent selon le sexe (température orale masculine : 35,7-37,7 °C ; féminine : 33,2-38,1 (Sund-Levander et al. 2002), mais surtout en fonction des modes de vie (degré de mastication, consommation de boissons et d'aliments chauds ou froids, régimes spéciaux, cigarettes, alcool) (Kelly 2007). Les microorganismes doivent donc s'adapter à ces

variations, mais à notre connaissance, il n'y a pas eu d'études publiées sur l'effet de ce facteur. La température utilisée dans les études « orales » *in vitro* est toujours fixée à 37°C (Fozo et al. 2004; Bradshaw et al. 2002; Chen and Burne 1996).

Le taux d'humidité relative est un paramètre important pour le développement et la maintenance bactérienne. Il est souvent pris en compte au travers du paramètre « activité de l'eau » qui doit être inférieur à 0,95 pour permettre une croissance bactérienne. Dans la bouche, la composition aqueuse de la salive est de plus de 99% (Parret et al. 1982). A notre connaissance, aucun travail n'a porté sur l'impact du taux d'humidité, qui n'est pas un facteur limitant dans la bouche, puisque celle-ci est en permanence baignée par la salive et le fluide gingival (Gracieux et al. 2006).

### **II.2.2.2 pH**

Le pH moyen de la salive est compris entre 6,75 et 7,25, la valeur la plus acide étant attribuée à la salive non stimulée tandis que la salive stimulée est plus basique (Marsh and Martin 2009; Bardow et al. 2000). Le pH est maintenu grâce au pouvoir tampon de la salive (chapitre II.2.1.3), qui limite les variations de pH consécutives à la consommation d'aliments et à l'action des bactéries (Gracieux et al. 2006). En revanche, le pH de la plaque dentaire varie plus fortement, en raison de la faible diffusion de la salive dans les biofilms dentaires. Les acides peuvent ainsi s'y accumuler et acidifier jusqu'à pH 4-5 (Jensen et al. 1982). Compte tenu de ces variations, l'effet du pH sur les bactéries orales a fait l'objet de nombreuses études, en particulier chez les streptocoques (Quivey et al. 2000).

Généralement, les bactéries sont sensibles aux variations de pH et la majorité des bactéries buccales ont un pH optimum entre 6 et 7,8 (pH 7 pour *S. salivarius*) (Gracieux et al. 2006; Barry 1966). Mais les streptocoques oraux, bien adaptés aux pH acides, peuvent poursuivre leur croissance jusqu'à des valeurs faibles de pH dans les biofilms (pH 4,8 et pH 4,9 pour *S. mutans* et *S. salivarius*, respectivement) (Bender et al. 1985). Pour résister à l'acidification, ces bactéries adoptent diverses stratégies d'adaptation (Quivey et al. 2000). *S. mutans* limite l'acidification de son cytoplasme en privilégiant l'utilisation de l'enzyme F1F0-ATPase qui expulse les protons intracellulaires en consommant de l'énergie (ATP) (Figure 5) (Cotter and Hill 2003; Dashper and Reynolds 1992; Belli and Marquis 1991). Cette protéine membranaire est composée d'un complexe F0, enchâssé dans la membrane, qui forme un canal permettant le transport des protons, tandis que le complexe F1, situé dans le cytoplasme, synthétise ou hydrolyse l'ATP (Nannen and Hutkins 1991). Chez les bactéries lactiques, l'activité d'hydrolyse de l'ATP couplée à l'expulsion



de protons augmente à pH acide, et joue un rôle clef dans le maintien du gradient de pH (Nannen and Hutkins 1991).

D'autres bactéries comme *S. sanguis* et *S. salivarius* génèrent des composés alcalins. *S. salivarius* possède une activité uréase, qui permet l'hydrolyse de l'urée, en générant deux molécules d'ammoniaque et une molécule de CO<sub>2</sub> (Chen et al. 2000). *S. salivarius* est d'ailleurs considéré comme le principal contributeur à l'uréolyse dans la bouche (Sissons et al. 1989). Le potentiel alcalinisant de l'ammoniaque produit compense partiellement l'acidification due à la synthèse d'acide lactique (Burne 1998; Sissons and Hancock 1993). La synthèse d'uréase chez *S. salivarius* augmente d'ailleurs en condition acide et en excès de sucres (Chen and Burne 1996; Sissons et al. 1990). De son côté, *S. sanguis* active un système de désamination de l'arginine qui dégrade l'arginine et permet la production d'ornithine, de CO<sub>2</sub> et d'ammoniaque (Quivey et al. 2000; Casianocolon and Marquis 1988).

### **II.2.2.3 Oxygène et potentiel d'oxydoréduction**

Le taux d'oxygène et le potentiel redox sont fortement liés, puisque l'oxygène, en tant qu'accepteur d'électrons, contribue à augmenter le potentiel redox (Eh) et donc le niveau d'oxydation dans les milieux (Leke et al. 1999). Dans la bouche, le potentiel redox et la concentration en oxygène varient en fonction des sites. Sur la surface de la langue, la tension en oxygène varie de 12 à 17% (v/v), soit des valeurs proches de celle de l'atmosphère (21%) (Morris 1979; Eskow and Loesche 1971). Le potentiel redox sur la langue et dans la salive est positif, et compris entre +240 et +300mV (Gracieux et al. 2006; Morris 1979; Turner and Crowell 1947). Sur l'émail nu, il varie entre +200 et +542 mV. Sous l'action fermentaire des bactéries orales, en particulier des streptocoques, le potentiel redox peut diminuer jusqu'à -140 mV (Marsh and Martin 2009; Gracieux et al. 2006; Leke et al. 1999). Cette réduction est favorable à la croissance de bactéries anaérobies plus exigeantes, telles que *Porphyromonas gingivalis* ou *Fusobacterium nucleatum* (Leke et al. 1999).

Ces deux paramètres environnementaux influencent le comportement des bactéries orales dans la bouche. Les espèces bactériennes anaérobies, notamment les streptocoques, préfèrent des conditions réduites et une faible concentration en oxygène puisqu'ils ne peuvent pas l'utiliser dans leur métabolisme énergétique du fait de l'absence de cytochrome oxydase (Marsh and Martin 2009).

L'oxygène, molécule plutôt stable est incapable d'oxyder spontanément les acides nucléiques et acides aminés (Imlay 2003). Par contre, les espèces réactives de l'oxygène qui en dérivent (ROS), comme l'anion superoxyde ( $O_2^{\circ-}$ ), ou le radical hydroxyle ( $HO^\circ$ ), et le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) peuvent provoquer un stress oxydatif chez les bactéries. Ces éléments peuvent être produits spontanément par réaction entre des éléments réducteurs et l'oxygène ou par voie enzymatique (Atlan et al. 2008; Choe and Min 2005). Leur présence va provoquer une oxydation et une élévation du potentiel redox, et perturber la physiologie cellulaire des cellules anaérobies (Halliwell and Gutteridge 1990). Ainsi, *S. mutans* multiplie par 1,3 son temps de génération en aérobiose (Shimamoto et al. 1990), tandis que la génération artificielle de ROS pendant 2 h réduit de 3 log la concentration de *Lactococcus lactis* et *Lactobacillus plantarum* (Patel and Nou 2008). Les ROS agissent principalement en oxydant les lipides, les protéines et acides nucléiques (Atlan et al. 2008). La présence d' $OH^\circ$  dans des cultures aérées de *L. lactis* endommage par exemple l'ADN, puisqu'un mutant du gène *recA* (nécessaire à la réparation de l'ADN) est beaucoup plus sensible à l'aérobiose que la souche sauvage (Duwat et al. 1995). De plus, chez *S. thermophilus* traité avec 5 mM d' $H_2O_2$ , le taux de survie atteint moins de 5% (Thibessard et al. 2001). Une inhibition de la glycéraldéhyde-3-phosphate et une augmentation de la perméabilité chez les bactéries lactiques sont également indiquées par plusieurs auteurs lors d'un stress oxydatif (Van de Guchte et al. 2002; Piard and Desmazeaud 1991).

Pour se protéger du stress oxydatif, les bactéries tentent à diminuer le taux de ROS en métabolisant l'oxygène en composés moins toxiques, principalement de l'eau, via l'action d'enzymes de détoxification (Marsh and Martin 2009; Bowden and Hamilton 1998). Ces enzymes, en nombre limité chez les bactéries lactiques (Marsh and Martin 2009; Van de Guchte et al. 2002; Bowden and Hamilton 1998; Piard and Desmazeaud 1991), sont listées dans le Tableau 6, qui précise les réactions enzymatiques correspondantes.

Tableau 6 : Réactions enzymatiques impliquées dans le métabolisme de l'oxygène et catalysées par les bactéries lactiques orales, adapté de Bowden and Hamilton (1998); Piard and Desmazeaud (1991).

Enzyme	Réaction générée
Superoxyde dismutase (SOD)	$O_2^- + O_2^- + 2 H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
NADH- $H_2O_2$ -oxydase	$NADH + O_2^- + H^+ \rightarrow H_2O_2 + NAD^+$
NADH- $H_2O$ -oxydase	$2 NADH + 2 O_2^- + 2 H^+ \rightarrow 2 H_2O + 2 NAD^+$
NADH peroxidase	$NADH + H^+ + H_2O_2 \rightarrow H_2O + NAD^+$
Glutathion peroxidase	$2 GSH^* + H_2O_2 \rightarrow GSSG^* + 2 H_2O$
Glutathion réductase	$GSSG^* + NADPH \rightarrow 2 GSH^* + NADP^+$

\*GSSG correspond à la forme oxydée du glutathion et GSH à sa forme réduite

Ainsi, pour éviter l'accumulation d' $O_2^-$ , *S. mutans*, *S. faecalis* et *S. salivarius* synthétisent la superoxyde dismutase (SOD) (Gregory and Fridovich 1973; McCord et al. 1971)(NCBI, *S. salivarius* SK126). Après exposition à l'oxygène, *S. salivarius* synthétise également des enzymes antioxydantes comme la glutathion réductase et la glutathion peroxydase (communication personnelle), qui réduisent la teneur en peroxyde d'hydrogène (Tableau 6). Chez *F. nucleatum* et *S. mutans*, la NADH oxydase aide les cellules à croître en conditions aérées, en réduisant le taux d' $O_2^-$  (Diaz et al. 2000; Higuchi et al. 1993). Cette enzyme, présente également chez *S. salivarius* produit du  $H_2O_2$ , tandis qu'une NADH oxydase variante, permet également la production d'eau chez *S. mutans* (Higuchi et al. 1993)( NCBI, *S. salivarius* SK126). De plus, des auteurs montrent une surexpression des gènes codant pour des enzymes de résistance aux stress oxydatif (NADH oxydase, glutathion réductase, lactate oxydase, superoxyde dismutase) chez *S. pyogenes* cultivé en salive humaine (Shelburne et al. 2005). Cette machinerie enzymatique complexe permet aux streptocoques oraux, et en particulier à *S. salivarius*, de se développer et de survivre même en conditions oxydantes (Marsh and Martin 2009). Lors de co-cultures en conditions oxydantes (Eh de +90 à +140 mV) avec des bactéries isolées de la cavité buccale, les trois espèces de streptocoques introduites (*S. mutans*, *S. oralis*, *S. gordonii*) dominent la culture, pour atteindre 35% de la flore cultivable (Bradshaw et al. 1996a). Si la croissance en aérobiose affecte le taux de croissance, la biomasse n'est pas diminuée chez *S. mutans* en conditions oxydantes (Eh = +104 mV) (Diaz et al. 2000; Shimamoto et al. 1990).

Il faut cependant noter que, à l'exemple de la NADH oxydase, certaines réactions de protection contre le stress oxydant peuvent induire la production de peroxyde d'hydrogène (Tableau 6), néfaste pour les bactéries lactiques, qui ne possèdent pas de catalase (Garcia-Mendoza et al. 1993; Carlsson et al. 1983), mais aussi pour les cellules humaines (Halliwell and Gutteridge 1990). Cependant, des facteurs exogènes aux bactéries lactiques, telles que les peroxydases salivaires (cf: II.2.1.4.3.3), ou l'action d'autres bactéries orales à catalase positive (*Staphylococcus*, *Neisseria*, *Actinomyces*, *Rothia*, *Klebsiella*) peuvent limiter l'effet négatif de l' $H_2O_2$  (Marsh and Martin 2009).

Par ailleurs, l'impact du stress oxydant dépend des conditions dans lesquelles se trouve le microorganisme. La composition du milieu de culture influence la sensibilité de certaines bactéries orales aux agents oxydants. Ainsi, la sensibilité de *Porphyromonas gingivalis* en aérobiose est accrue en milieu défini minimum (1% d'albumine bovine), par rapport à un milieu plus riche (bouillon Todd Hewitt) (Leke et al. 1999). Ce résultat indique qu'en conditions nutritionnelles pauvres, les bactéries sont plus sensibles aux effets délétères des agents oxydants,

ou bien que la synthèse d'enzymes de protection est moins efficace qu'en milieu riche. De plus, Thibessard et al. (2001) ont montré que la réponse au stress oxydatif était inductible chez *S. thermophilus*. Une exposition à 5 mM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> engendre 60% de survie chez des cellules préalablement soumises à 1mM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, contre 5% de survie chez des cellules non traitées. Il semble que la phase de croissance influe également sur la sensibilité au stress acide. Ceci a notamment été démontré chez le genre *Lactobacillus*, puisqu'en phase exponentielle, la concentration cellulaire des 10 espèces testées diminue de plus de 3 log en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tandis qu'en phase stationnaire, seulement 5/10 espèces sont touchées (Parente et al. 2010).

#### ***II.2.2.4 Apport de nutriments et carence nutritionnelle***

##### ***II.2.2.4.1 Apports nutritionnels dans la bouche***

La disponibilité des nutriments est un paramètre important pour le développement bactérien. Dans la bouche, on peut distinguer deux types d'apports, les apports endogènes fournis par l'hôte et les apports exogènes via les repas ingérés.

La salive elle-même est une source de nutriments pour la croissance bactérienne (Marsh and Martin 2009; Barsotti 2006; Bowden and Hamilton 1998). Elle contient notamment des acides aminés, peptides, protéines et glycoprotéines, la principale étant la mucine. Cette dernière, sous l'action des glycosidases bactériennes est clivée et peut être utilisée comme source de sucres et d'azote (Renyé et al. 2004; Bradshaw et al. 1994; Cowman et al. 1979). Cette action a un caractère synergétique puisque certaines bactéries (dont *S. salivarius*) dégradent la partie glycosidique de la mucine, libérant ainsi des composés carbonés et protéiques, qui deviennent disponibles pour d'autres bactéries orales (Sterer and Rosenberg 2006; Van der Hoeven and Camp 1991; De Jong and Van Der Hoeven 1987). Cependant, si quelques études *in vitro* en salive humaine décrivent une croissance bactérienne en utilisant la mucine (Periasamy et al. 2009; Cowman et al. 1979), d'autres auteurs démontrent plutôt que la mucine joue un rôle de maintenance en absence d'ajout de glucose (De Jong and Van Der Hoeven 1987; De Jong et al. 1984).

Dans tous les cas, les bactéries orales sont soumises à une alternance « feast and famine » (Carlsson 1984), caractérisée par une période d'apports exogènes courte (feast), suivi d'une phase de carence plus longue (famine) (Bowden and Hamilton 1998; De Jong and Van Der Hoeven 1987). Enfin, en dépit de la complexité des repas, certains auteurs indiquent que seuls les sucres influencent l'écologie buccale (Marsh and Martin 2009; Barsotti 2006).

#### II.2.2.4.2 Réponses physiologiques à la carence nutritionnelle

La carence nutritionnelle chez les bactéries résulte d'un manque d'un ou plusieurs nutriments dans leur environnement. Elle est de courte durée chez les bactéries orales puisqu'elle correspond à la période entre deux repas, soit quelques heures (Busuioc et al. 2010). Au niveau macroscopique, plusieurs réponses cellulaires sont mises en place lors d'une carence. La principale est l'arrêt de la croissance et le passage en phase stationnaire (Renyé et al. 2004; Trainor et al. 1999). Celui-ci permet aux cellules de réserver l'énergie à des fonctions essentielles et à leur maintenance (Kim et al. 2001; Giard et al. 1997). Ainsi, Chavez de Paz et al. (2008) ont montré que l'activité déshydrogénase disparaît après 24h de carence en sucres, conduisant à une inactivation des cellules. Des modifications morphologiques, telles qu'une diminution de la taille des cellules de *L. lactis*, et une instabilité morphologique des colonies de *S. pyogenes* ont également été démontrées (Kim et al. 2001; Leonard et al. 1998). Chez des souches de *S. mutans* résistantes aux stress nutritionnels, la morphologie évolue ainsi de diplocoques ou cellules isolées à des chainettes de plus en plus longues au cours d'une carence (Busuioc et al. 2010). L'apparition de bactéries viables non cultivables est une autre conséquence des conditions de carence (McDougald et al. 1998). Trainor et al. (1999) ont ainsi montré chez *S. pyogenes*, qu'après 9 jours de carence nutritionnelle, on dénombre seulement  $1 \cdot 10^3$  CFU/mL, tandis qu'un marquage intracellulaire (DAPI) fait état de  $1 \cdot 10^8$  cellules/mL. Enfin, certaines souches de *S. thermophilus* induisent une lyse cellulaire irréversible en conditions de carence en lactose (Husson-Kao et al. 2000). Ce phénomène n'a toutefois pas encore été démontré chez les espèces bactériennes de la bouche.

Ces changements macroscopiques sont la conséquence de plusieurs modifications du métabolisme suite aux carences. La première réponse correspond à une dégradation des protéines, démontré chez *E. faecalis*, et *L. lactis*, ce qui permet de créer un pool d'acides aminés, utilisé ensuite pour la synthèse de protéines spécifiques aux conditions de stress, carencé ou non (Chatterji and Kumar Ojha 2001; Giard et al. 1997; Kunji et al. 1993). En effet, certaines de ces protéines appartiennent aux protéines de choc thermique (HSP) (Giliberti et al. 2002; Kolter et al. 1993). Ces protéines chaperonnes participent à la protection des protéines et restreignent les dommages cellulaires, potentiellement causés par une perte de fonction protéique due à un mauvais repliement tridimensionnel (Lemos et al. 2005). Leur synthèse est aussi observée à la suite d'autres stress, notamment acide, osmotique, ou thermique (Wang et al. 2011; Svensater et al. 2000). Elles constituent un mécanisme de résistance croisé, puisque plusieurs auteurs ont démontré une meilleure résistance aux stress acide, oxydatif, thermique et osmotique lorsque les

cellules sont préalablement exposées à un stress nutritionnel (Wang et al. 2011; Zhu et al. 2001; Svensater et al. 2000; Giard et al. 1997; Jenkins et al. 1988).

Des protéines spécifiques sont également synthétisées en situation de carence nutritionnelle, notamment chez *L. lactis* (Sanders et al. 1999; Kunji et al. 1993), *Lb. acidophilus* (Wang et al. 2011; Lorca and de Valdez 2001), ou *S. mutans* (Svensater et al. 2000). Chez *E. faecalis*, Giard et al. (1997) ont divisé ces protéines spécifiques en quatre catégories, selon leur niveau et leur durée d'expression au cours de la carence :

- ✓ Protéines présentes en phase de croissance et surexprimées en carence ;
- ✓ Protéines apparaissant uniquement en début de période de carence (0 à 6 h). Elles peuvent correspondre à des régulateurs de gènes requis pour des périodes limitées ;
- ✓ Protéines présentes durant toute la carence mais dont la synthèse diminue au cours du temps ;
- ✓ Protéines sur-synthétisées en période avancée de carence (de 6h à 24h).

De nombreuses protéines synthétisées de façon différentielle en carence nutritionnelle sucrée appartiennent aux voies métaboliques d'utilisation des sucres et de production d'énergie, indiquant ainsi que les cellules mettent en place une stratégie de survie (Hussain et al. 2009). Parmi ces protéines spécifiques, on retrouve chez *E. faecalis* la synthèse d'une carbamate kinase en carence de glucose, capable de générer de l'ATP à partir du métabolisme de l'arginine (Giard et al. 1997). En carence de sucre, les streptocoques oraux, notamment *S. mutans* favorisent le transport des sucres via les systèmes PEP-PTS à haute affinité, moins coûteux énergétiquement que le système perméase (cf : p15) (Lemos et al. 2005; Bowden and Hamilton 1998). Enfin, la voie glycolytique est progressivement réprimée chez les streptocoques oraux et *L. lactis* par l'inhibition de la pyruvate kinase, de la fructose 1,6 diphosphatase, de la glyceraldéhyde-3-P-deshydrogénase et de l'aldolase (Bowden and Hamilton 1998; Kunji et al. 1993). Cette inhibition de la glycolyse est accentuée par une dégradation accrue du glycogène intracellulaire (Bowden and Hamilton 1998).

Ces données métaboliques sont confortées au niveau génétique puisque plusieurs auteurs ont montré que les gènes *dnaK*, *groEL*, *clpP* et *clpC*, codant pour des protéines de stress général sont induits en carence nutritionnelle chez *S. pyogenes* (Steiner and Malke 2001). De même, Shelburne et al. (2005) concluent à une surexpression des gènes des systèmes de transport de type PTS et de l' $\alpha$ -amylase lors d'une culture en salive humaine, en conditions de carences. Les réponses transcriptomiques aux carences nutritionnelles sont nombreuses et variables selon

l'espèce, le type de stress et les conditions de culture. Chez *L. lactis*, plus de 700 gènes sont différentiellement exprimés entre la phase exponentielle et la phase stationnaire avec une carence nutritionnelle. Parmi ces gènes, ceux qui sont sous-exprimés appartiennent à différentes fonctions telles que la transcription, la traduction, la synthèse de nucléotides, le métabolisme de l'enveloppe cellulaire et la division cellulaire (Redon et al. 2005b). En revanche, les gènes de la compétence et ceux du métabolisme de sources carbonées alternatives sont induits lors de la carence (Redon et al. 2005b). Ces résultats sont confirmés Chez *S. thermophilus*, puisque le gène *recA*, qui favorise la compétence, est induit en carence nutritionnelle sucrée, et son absence (par mutation) provoque une chute de la viabilité (Giliberti et al. 2002).

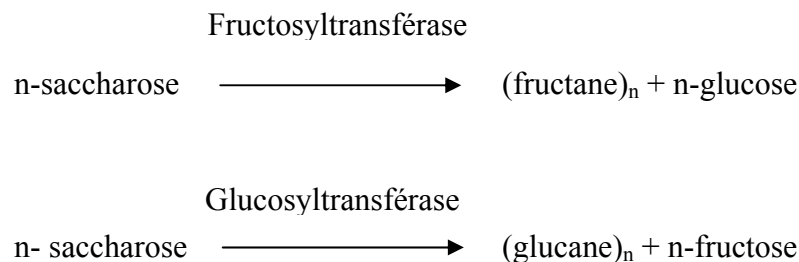
Concernant la carence azotée, le gène *codY* qui régule le métabolisme de l'azote, est induit chez *S. mutans* en carence d'acides aminés (Lemos et al. 2008). D'autres études dans ces mêmes conditions chez *S. pyogenes* ont montré l'induction de nombreux gènes codant pour des synthèses d'aminoacyl-ARNt (*alaS*, *ileS*, *glyQS*, *pheST*, *thrS*, *trpS*, *valS*), pour des peptides ciblant les protéines anormales pour hydrolyse (*ssrA*, *smpB*, *clpP*, *clpC*), pour des protéines chaperonnes (*groES*, *groEL*, *dnaK*, *dnaJ*), des perméases et peptidases (*opp*, *pepB*), mais aussi plusieurs facteurs de virulence de cette espèce (*fas*, *sag*, *luxS*, *covRS*, *ropB*) (Steiner and Malke 2001). De plus, les streptocoques oraux développent une réponse stringente au stress nutritionnel azoté, caractérisée par l'accumulation du nucléotide (p)ppGpp (guanosine tétra (penta)phosphate) (Lemos et al. 2005). Cette réponse a également été reliée à une carence carbonée chez *E. coli* et *B. subtilis* (Bernhardt et al. 2003; Crosse et al. 2000). En termes de mécanismes, il est acquis que (p)ppGpp agit négativement sur la transcription, en diminuant la durée de vie du complexe formé par l'ARN polymérase et le promoteur de l'ARN ribosomique chez *E. coli* (Barker et al. 2001), et *S. mutans* (Lemos et al. 2007), ce qui inhibe la transcription de l'ARNr (Lemos et al. 2007; Barker et al. 2001), et par conséquent la synthèse des ribosomes qui en sont constitués. Un second modèle est basé sur le constat que (p)ppGpp favorise la fixation d'un facteur sigma alternatif (Jishage et al. 2002), comme cela a été démontré chez *E. coli* et *B. subtilis* avec la fixation d'un facteur sigma spécifique à la carence nutritionnelle ( $\sigma$ ), (Bernhardt et al. 2003; Carlsson 1997).

#### II.2.2.4.3 Réserves énergétiques

Le manque de nutriments génère également l'utilisation du glycogène intracellulaire et la synthèse de polysaccharides bactériens (Wilson et al. 2010; Lemos et al. 2005; Wilkinson 1963). Le glycogène bactérien, de taille moléculaire comprise entre  $10^7$  et  $10^8$  Da, est constitué d'une chaîne de 8 à 12 molécules de glucose, et n'a pas d'effet sur la pression osmotique interne à

concentration physiologique. Il est formé en phase stationnaire chez les bactéries, lorsque la croissance est limitée par des nutriments autres que le carbone (Wilson et al. 2010; Wilkinson 1963). Lors d'une carence en substrat carboné, la dégradation du glycogène en glucose-1-phosphate par les streptocoques oraux, participe au maintien de la viabilité cellulaire en fournissant de l'énergie pour la maintenance (Bowden and Hamilton 1998; Wilkinson 1963). Busuioc et al. (2009) ont ainsi montré que le glycogène est rapidement utilisé, dès le premier jour de carence, chez *S. mutans*, et que l'inactivation de la glycogène synthase diminue de 15 jours la survie de cette espèce en conditions de carence en glucose.

Les bactéries orales comme *S. salivarius* sont également capables de produire des exopolysaccharides (fructane et glucane) à partir du saccharose, selon les réactions suivantes (Marsh and Martin 2009; Townsend-Lawman and Bleiweis 1991) :



Ces EPS peuvent constituer une réserve énergétique puisque grâce aux fructanases (glucanase), le fructane (glucan) pourrait être transformé en fructose, puis assimilé chez *S. mutans* (Colby and Russell 1997; Townsend-Lawman and Bleiweis 1991). Les EPS seraient donc une source additionnelle de sucres pour les streptocoques oraux en absence de sources exogènes, c'est-à-dire en carences nutritionnelles (Russell 2010). Ainsi, Burne et al. (1996) montrent que des rats infectés avec une souche de *S. mutans* dépossédée de son activité fructanase présentent moins de caries qu'avec la souche sauvage, après un régime limité en saccharose. En revanche, le taux de caries est identique pour les deux souches lorsque les rats sont nourris *ad-libitum*. Cette observation illustre bien l'utilisation des exopolysaccharides en cas de manque en saccharose.

Finalement, ces réponses permettent aux bactéries orales de s'adapter aux périodes répétées de carence nutritionnelle, telles que celles rencontrés dans la bouche (Busuioc et al. 2010). Ainsi, l'espèce *S. mutans* peut survivre pendant 12 jours avec 6mM de glucose dans un milieu chimiquement défini (Renyé et al. 2004), et pendant plus de 41 jours dans un milieu contenant 200 mM de glucose (Busuioc et al. 2009). Cette étude montre aussi que la présence de 0,5% de



mucine permet de compenser l'absence de glycogène synthase et d'obtenir le même taux de viabilité pour les cellules mutées et sauvages (Busuioc et al. 2009), ce qui est confirmé par Renye et al. (2004). La mucine aide donc les bactéries orales à résister aux périodes de carences.

#### II.2.2.4.4 Alternance de phases de croissance et de carence

La plupart des réponses aux carences nutritionnelles sont réversibles, puisque lorsque des nutriments sont de nouveau apportés, la croissance reprend et le métabolisme revient aussitôt à son niveau d'avant carence chez les bactéries orales *S. anginosus* et *L. salivarius*, mais également chez *L. lactis* ou *Vibrio* spp. ou *Staphylococcus aureus* (Chavez de Paz et al. 2008; Clements and Foster 1998; Marouga and Kjelleberg 1996; Kunji et al. 1993). Ainsi, l'activité déshydrogénase, nulle après 24 h de carence en sucre chez *L. salivarius* et *S. anginosus*, est retrouvée chez toutes les cellules 2 h après l'ajout de glucose (Chavez de Paz et al. 2008). De même, des cellules en phase stationnaire de *L. lactis* reprennent leur croissance 2 h après l'ajout de 5 mM de saccharose, et la voie glycolytique qui était inhibée en début de carence, retrouve son niveau initial 3 h après cet ajout (Kunji et al. 1993).

Selon Clements and Foster (1998), le temps nécessaire à la reprise de croissance n'est pas affecté par la durée de la période de carence. Chez *Staphylococcus aureus*, il reste compris entre 120-150 min quelle que soit la durée de la carence (2 à 26 jours) (Clements and Foster 1998). En revanche, chez *S. mutans*, le temps de latence est négativement affecté par la durée de la carence en certains acides aminés, puisqu'il varie de 30 min pour 1 h de carence à 130 min après 6 h de manque nutritionnel en leucine et cystéine (Mattingly 1977). Ce résultat est confirmé chez *S. cremoris* sur la reprise de l'activité glycolytique (Poolman et al. 1987). La reprise de croissance est plus rapide lorsque les bactéries sont cultivées à l'état planctonique (2 h) qu'en biofilm (72 h), comme cela a été démontré chez *L. salivarius* et *S. anginosus*, en lien avec la lenteur réactionnelle des biofilms (Chavez de Paz et al. 2008).

L'apport de nutriments après une carence nutritionnelle conduit, par ailleurs, à une augmentation de la synthèse protéique très rapide, comme cela a été démontré chez *Vibrio* spp. (3 min après l'ajout de nutriments) et *Staphylococcus aureus* (10 min contre 150 pour la reprise de croissance) (Clements and Foster 1998; Marouga and Kjelleberg 1996). Ces auteurs expliquent cette reprise par le maintien d'un pool d'ARNm pendant la carence, dont la traduction est induite par l'addition de substrats. Ce maintien est lié à l'augmentation de la demi-vie des ARNm et donc à un accroissement de leur stabilité en conditions de carence, comme démontré chez *L. lactis* (Redon et al. 2005a). Cette synthèse protéique est essentielle puisque son inhibition (ajout de

chloramphénicol) empêche le recouvrement des facultés glycolytiques de *L. lactis* après une carence en sucres et acides aminés de 4 et 8 h (Kunji et al. 1993).

Une étude en culture mixte continue de 9 bactéries orales, subissant une alternance « feast and famine » constituée d'un apport quotidien de 28 mM de glucose montre que toutes les bactéries se maintiennent pendant les 10 jours testés (Bradshaw et al. 1989). Ces auteurs observent en outre une augmentation de la concentration en CFU chez les streptocoques (*S. mutans* et *S. sanguis*), 6 h après chaque repas. En revanche, la concentration de *Bacteroides intermedius* ne semble pas impacté par les pulses de glucose, et celle de *Lactobacillus casei* varie positivement ou négativement selon les jours (Bradshaw et al. 1989). Finalement, les résultats de l'ensemble de ces travaux permettent de conclure que les bactéries orales sont bien adaptées à cette alternance d'abondance et de carence nutritionnelle (Busuioc et al. 2010).

## **II.3 Simulation de l'environnement oral in vitro**

Il existe de nombreuses études *in vivo* traitant de la relation entre les microorganismes oraux et l'environnement buccal. Cependant, la forte hétérogénéité des conditions physiologiques rencontrées dans la bouche en fonction de l'hôte limite l'obtention de résultats reproductibles (Sissons 1997). C'est pourquoi, certains microbiologistes ont développé des systèmes permettant de reproduire, *in vitro*, des conditions simulant celles de la cavité buccale, en particulier de la plaque dentaire. Deux éléments sont pris en compte dans la création de ces systèmes : le mode de culture (milieu liquide ou biofilm, culture discontinue ou continue) et la composition du milieu de culture (salive réelle, salive artificielle ou milieux riches).

### **II.3.1 Modes de culture et bioréacteurs associés**

#### ***II.3.1.1 Cultures en batch***

La culture en batch en milieu liquide est la principale méthode utilisée en recherche, puisqu'elle permet de contrôler aisément des paramètres tels que la température, le pH ou l'atmosphère. Cette technique est ainsi utilisée en microbiologie orale pour évaluer la croissance de bactéries soumises à des excès ou des carences en glucose (Renyé et al. 2004; De Jong et al. 1984). D'autres études en milieu liquide et en batch portent sur l'efficacité d'agents antimicrobiens sur les bactéries orales (lactobacilles) (Ahumada Ostengo et al. 2005), ou sur les effets de mutations génétiques sur la croissance et les activités enzymatiques de *S. salivarius* (Weaver et al. 2000). Il faut également noter l'existence de modèles de biofilms conduits en mode batch, comme le

modèle de Zurich. Il se compose d'une plaque multipuits, contenant chacun un disque d'hydroxyapatite baigné d'une solution de salive humaine et de milieu synthétique. Ce système permet la croissance simultanée de plusieurs biofilms oraux mais ne permet pas de réguler le pH et les conditions atmosphériques (Guggenheim et al. 2004).

Les cultures en batch sont ainsi utilisées pour évaluer les réponses précises des bactéries orales à une modification génétique ou de l'environnement. Cependant, l'apport unique de nutriments en début de culture engendre un taux de croissance rapide puis une phase stationnaire de durée indéfinie, ce qui est rare dans la nature. La majorité des écosystèmes buccaux fonctionnent plutôt selon un mode continu, avec un renouvellement continu de la salive (production par les glandes salivaires et déglutition) et un apport discontinu de nutriments (McBain 2009). *In vitro*, ces systèmes permettent un meilleur contrôle des taux de croissance et des variables environnementales (McBain 2009). C'est pourquoi, la culture continue, plutôt en biofilm, est préférée en microbiologie orale.

### **II.3.1.2 Biofilms buccaux**

La majorité des travaux réalisés en biofilms concernent des bactéries de la plaque dentaire, écosystème organisé en biofilm (McBain et al. 2003; Zampatti et al. 1994; Pratten et al. 1998a). Or, les propriétés métaboliques et de croissance des bactéries en biofilm diffèrent de celles observées en conditions planctoniques. Ainsi, chez *Lactobacillus salivarius* et *S. anginosus*, le recouvrement du métabolisme après une carence est plus long en biofilm (72 h) qu'en culture planctonique (2 h) (Chavez de Paz et al. 2008). De plus, il a été montré chez trois espèces de lactobacilles (*Lb. plantarum*, *Lb. brevis* et *Lb. fructivorans*) que les bactéries organisées en biofilms sont plus résistantes à des composés délétères tels que l'éthanol ou l'acide acétique (Kubota et al. 2008). C'est pourquoi, deux catégories de modèles d'études de cultures continues générant des biofilms et simulant la cavité buccale, ont été développées.

La première catégorie de modèles d'étude regroupe des systèmes simulant les biofilms, principalement de la plaque dentaire. Le premier modèle, créé en 1952, repose sur le principe de l'irrigation continue de dents animales (Pigman et al. 1952). Il consiste en une dent de cheval, déposée dans un entonnoir fermé d'un côté par un bouchon en caoutchouc. Une aiguille introduite dans le bouchon permet un apport régulier d'une solution nutritive sur la dent. Sur le même principe, le système développé par Zampatti et al. (1994) est constitué d'une molaire de rat, arrosée continuellement par de la salive artificielle (à un débit de 0,125 mL/min), et par des nutriments en flux continu ou discontinu. Ce système a été comparé aux dents d'un rat axénique,

*in vivo*. Le taux de croissance de *S. mutans* est similaire dans les deux conditions, ce qui permet de considérer le modèle *in vitro* comme un bon simulateur de l'environnement buccal (Zampatti et al. 1994). Cette application mériterait cependant d'être élargie à d'autres supports et d'autres bactéries avant d'être validée.

Selon un principe équivalent, un système modèle appelé CDFF (Constant Depth Film Fermenter) a été développé spécifiquement pour les études de la plaque dentaire (Figure 8) (Zanin et al. 2005; McBain et al. 2003; Pratten et al. 1998a; Pratten et al. 1998b). Développé initialement par Peters and Wimpenny (1988) pour tous types de biofilms bactériens, ce modèle a été adapté à l'étude des biofilms oraux (Wilson 1999). Il permet la génération simultanée d'un grand nombre de biofilms reproductibles (75 biofilms possibles par fermenteur) (Pratten et al. 1998b). Dans un système étanche, 15 plateaux contenant chacun 5 supports d'hydroxyapatite (de formule  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) sont répartis sur une table en rotation. L'introduction de gaz et de milieu de culture par des orifices permet de contrôler la croissance des biofilms se développant sur les surfaces d'hydroxyapatite. Le principal intérêt de ce système est de maintenir constante la profondeur du biofilm par un raclage fréquent, donc de contrôler l'accumulation de biomasse, et de favoriser l'établissement d'un système stable. La profondeur du biofilm varie selon les études : 200  $\mu\text{m}$  (McBain et al. 2003) ou 300  $\mu\text{m}$  (Pratten and Wilson 1999). L'apport de nutriments par un système de goutte à goutte, et la possibilité d'utiliser des surfaces variées pour le biofilm (hydroxyapatite, email, dentine) sont d'autres avantages de ce modèle d'étude (McBain 2009).

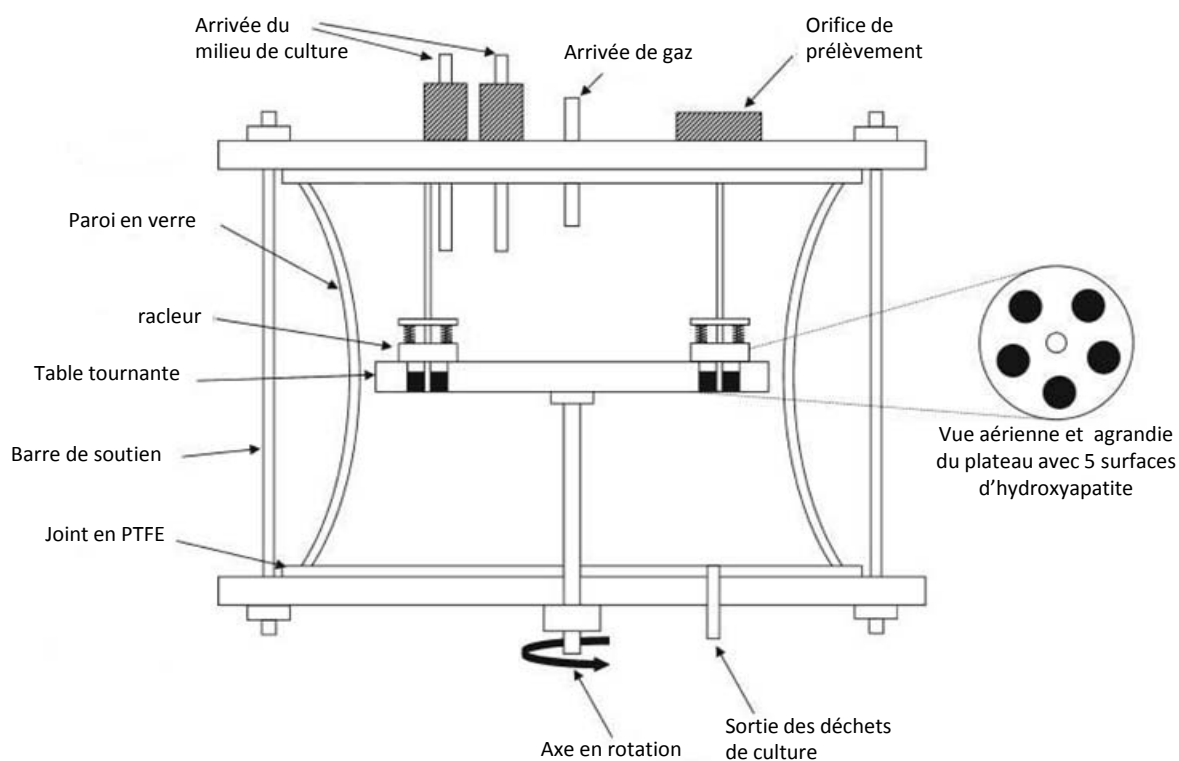


Figure 8 : Schéma du bioréacteur CDFD, d'après McBain (2009)

La seconde catégorie de modèle regroupe les réacteurs SSR (Suspended Substratum Reactor ou réacteur à substrat en suspension), qui sont basés sur l'immersion d'un support solide dans le milieu liquide d'une cuve alimentée en continu (McBain 2009). Ce support permet la formation d'un biofilm, avec une interface liquide-biofilm. Des bactéries sous forme planctonique coexistent avec les bactéries en biofilm dans le fermenteur (Marsh 1995). L'équipe de Bradshaw, spécialisée dans les cultures continues planctoniques, a développé en 1996 le premier système SSR. Le support solide est constitué d'hydroxyapatite pour simuler la surface des dents (Bradshaw et al. 1996a). Plus tard, Monoi et al. (2004) ont développé un système similaire, permettant en plus d'injecter une solution nutritive par impulsions (Figure 9).

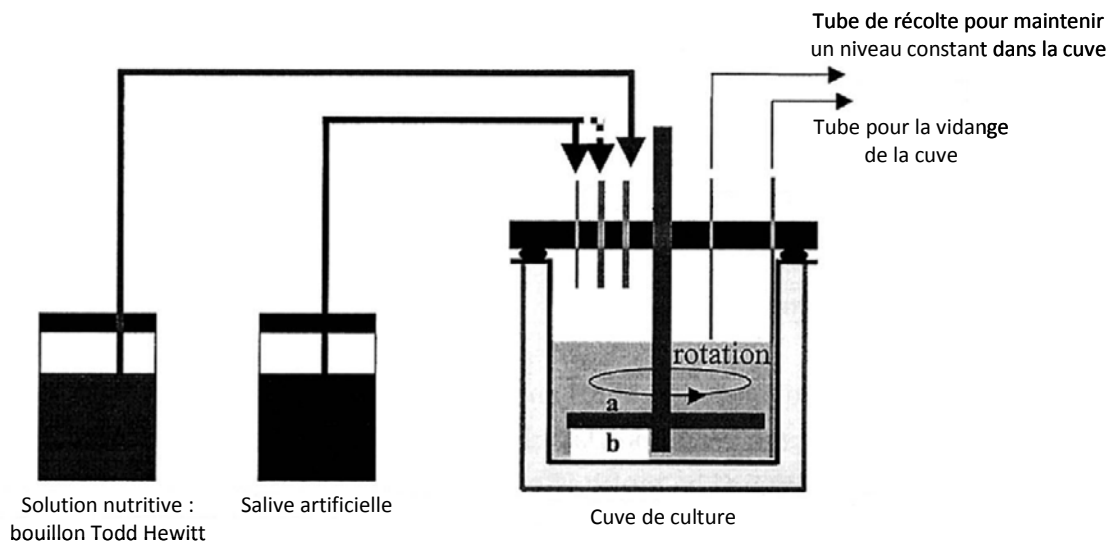


Figure 9 : Schéma du bioréacteur SSR développé par Monoi et al. (2004). (a) disque d'hydroxyapatite supportant le biofilm ; (b) racleur pour éviter la formation d'un biofilm au fond de la cuve

L'intérêt de ces modèles pour les études de croissance microbienne est double. En effet, ils permettent à la fois l'étude simultanée d'un biofilm et de la culture planctonique, et l'analyse de la mise en place du biofilm (Bradshaw et al. 1996a).

Finalement, bien qu'il existe des outils basés sur des méthodes différentes et de complexité variable, il n'y a pas de modèle idéal et peu de protocoles standardisés. Le choix d'un modèle d'étude dépend principalement de la problématique de recherche (McBain 2009). En outre, il faut noter que les modèles développés ont pour finalité principale d'étudier la plaque dentaire. Il existe, à notre connaissance, une seule étude portant sur la flore linguale (Pratten et al. 2003). Ce travail, basé sur l'inoculation d'une surface de poly-tétra-fluoroéthylène (PTFE) dans un CDFE par un échantillon microbien prélevé sur la langue de 10 sujets, a pour objectif de mesurer la production de composés soufrés volatils (VSCs) en lien avec l'halitose (Pratten et al. 2003). Le support retenu est cependant très loin de la structure de la langue, ce qui limite la pertinence des résultats obtenus.

### II.3.2 Milieux de culture utilisés pour l'étude des bactéries orales

Dans la littérature, les travaux relevant de la microbiologie orale sont réalisés dans différents types de milieux (salive réelle, salives artificielles ou milieux riches), chacun présentant des avantages et des inconvénients

### ***II.3.2.1 Utilisation de la salive naturelle***

A priori, la salive réelle est le milieu idéal pour simuler, *in vitro*, le milieu rencontré par les bactéries dans la cavité buccale. Plusieurs études décrivent la croissance de *Fusobacterium nucleatum* (Periasamy et al. 2009) et d'autres bactéries orales (*S. mutans*, *S. milleri* et *S. sanguis*, *Actinomyces viscosus*) (De Jong and Van Der Hoeven 1987; De Jong et al. 1984) en salive humaine. Une étude comparative de la survie de *S. pyogenes*, basée sur l'analyse de son transcriptome, a permis d'identifier les gènes lui permettant de survivre dans la salive humaine (Shelburne et al. 2005). Badet and Thebaud (2008) ont démontré l'effet inhibiteur du xylitol sur la formation de biofilms oraux, sur des disques d'hydroxyapatite recouvert de salive humaine stérile. Certains travaux considèrent la salive naturelle comme un composant d'un milieu plus complexe. Ils l'associent notamment avec de nombreux acides aminés, des ions, des vitamines, du glucose, des peptones et de l'urée (Merritt et al. 2009). Cependant, l'utilisation de la salive naturelle comme milieu de culture n'est pas toujours adaptée, et ce, pour plusieurs raisons :

- ✓ La difficulté de collecter de grands volumes de salive (Shellis 1978) ;
- ✓ La forte variation de composition salivaire selon les individus, qui empêche l'obtention de résultats reproductibles (Shellis 1978) ;
- ✓ La complexité de la composition de salive, rendant difficile l'identification de l'effet de chaque facteur salivaire séparément. Par exemple, Shelburne et al. (2005) ont identifié des gènes et voies métaboliques induites uniquement en salive naturelle, mais n'ont pas pu attribuer ces modifications à des facteurs salivaires en particulier ;
- ✓ L'endommagement des fonctionnalités salivaires pendant la stérilisation de la salive. Des essais de stérilisation avec des composés chimiques et des traitements physiques ont ainsi conduit à une détérioration des activités enzymatiques salivaires (traitements à l'oxyde d'éthylène, aux radiations, à la chaleur), à une absence de stérilité (traitements au peroxyde d'hydrogène, aux radiations) ou à la disparition de composés de grande taille (filtration) ou thermolabiles (traitements thermiques) (Shellis 1978; Williams and Kraus 1963) ;
- ✓ Le faible niveau de croissance microbienne en salive naturelle. Sans ajout de glucose, (De Jong et al. 1984) montrent ainsi qu'il n'y a pas de croissance des streptocoques oraux (*S. mutans*, *S. milleri* et *S. sanguis*), ni de *Actinomyces viscosus*. En revanche, l'ajout de 5 à 10 mM de glucose dans la salive permet le développement de ces quatre espèces.

En conséquence de ces inconvénients, peu de microbiologistes oraux utilisent la salive naturelle comme milieu de culture pour leurs travaux de recherche.

### ***II.3.2.2 Utilisation de milieux de culture synthétiques***

Les études portant sur l'analyse et la compréhension de comportements bactériens précis, en relation avec l'environnement buccal, s'appuient le plus souvent sur des milieux de culture classiques pour les bactéries étudiées. Ainsi, l'effet des enzymes buccales sur la croissance, la survie et la physiologie bactérienne a été testé en milieux riches : le lysozyme sur *S. mutans* en milieu TSYG (Wang and Germaine 1993), les peroxydases et l' $H_2O_2$  sur *S. mutans* en milieu BHI (Thomas et al. 1994). Les essais démontrant la présence de fibrils et fimbriae chez *S. salivarius* ont été effectués en milieu BHI (Handley et al. 1984). Pour les lactobacilles, le MRS est préféré pour tester les capacités d'adhésion sur des surfaces de verre et d'hydroxyapatite (Samot et al. 2011).

Si ces milieux sont faciles d'utilisation, les résultats obtenus ne sont cependant pas toujours transposables aux conditions buccales. En effet, la composition de ces milieux induit l'obtention d'états physiologiques microbiens différents de ceux rencontrés en salive naturelle. Cela est vérifié par Leke et al. (1999), qui montrent que la sensibilité du pathogène d'origine parodontale *Porphyromonas gingivalis* au peroxyde d'hydrogène est plus importante dans un milieu synthétique minimum que dans un bouillon Todd Hewitt.

Finalement, puisque ces milieux synthétiques ne simulent pas de façon satisfaisante la salive naturelle, et que l'utilisation de celle-ci s'avère trop complexe, un compromis possible consiste à développer des salives artificielles.

### ***II.3.2.3 Utilisation de salives artificielles***

Il existe à ce jour de nombreuses publications relatives au développement de salives artificielles, dont la composition est variable selon les auteurs et selon leurs objectifs. Le Tableau 7 recense les principaux travaux publiés sur le sujet.



Tableau 7 : Composition de différentes salives artificielles.

Les valeurs sont données en g/L sauf indication contraire

Objectif de l'étude	Etude de l'effet tampon de la salive (1)	Relargage d'arômes à partir de gels de pectine (2)	Etude des processus de digestion (3)	Culture de bactéries orales (4)	Culture de bactéries orales (5)	Culture de bactéries orales (6)	Culture de bactéries orales (7)	Culture de bactéries orales (8)
Composition	0,125	0,88	0,58					0,35
NaCl	0,964			1,16	1,21	2,5	0,2	0,2
KCl	0,19			0,22	0,585		0,2	
KSCN	0,654	1,37	0,43	0,354	0,26			
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,336							
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,178			0,233	0,51			
NH <sub>4</sub> Cl	0,172	0,44	0,02	0,158	0,22		0,3	0,2
CaCl <sub>2</sub>	0,631	5,21		0,535				
NaHCO <sub>3</sub>	0,017	0,22	0,01	0,017	0,017			
MgCl <sub>2</sub>				0,375				
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		0,5						
NaNO <sub>3</sub>			0,016					
KHCO <sub>3</sub>					0,26			
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>								
Urée	0,2			0,173	0,5		0,5	
Mucine		2,02		2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Albumine				0,025				
Créatinine				0,0001				
Choline				0,013				
Acide urique				0,01				
Hème						0,005		0,001
Acides aminés				0,04	2,26			0,1
Vitamines				0,0008	0,007	0,001		0,0002
α-amylase		200 U/ml	1	300 U/ml				
Lysozyme			0,1					
Extrait de viande							1	
Extrait de levure						5	2	1
Peptone						15	5	4
Références	(Gal et al. 2001)	(Hansson et al. 2003)	(Naim et al. 2004)	(Shellis 1978)	(Sissons et al. 2007; Wong and Sissons 2001)	(Bradshaw et al. 002;;Sissons et al. 1991; McKee et al. 1985)	(Zanin et al. 2005; Pratten et al. 1998b)	(McBain et al. 2003)

Apport nutritif  
supplémentaire

Dans le Tableau 7, les salives artificielles présentées, de composition variée, ont été mises au point pour des objectifs d'études différents, comme indiqué dans la première ligne du tableau. L'analyse de ce tableau montre que les salives artificielles contiennent principalement des ions, notamment sodium, chlorure, potassium, calcium, phosphate, bicarbonate et magnésium, qui sont les ions majoritaires de la salive naturelle (Tableau 5). Ces ions sont présents sous différentes formes chimiques, constituant ainsi la diversité des salives artificielles.

L'urée et la mucine, deux composés majeurs de la salive naturelle (Tableau 5) sont fréquemment introduites dans les salives artificielles. L'un des rôles de la mucine est de conférer sa viscosité à la salive. Elle est donc introduite dans certaines études axées sur le relargage de composés d'arômes (salive n°2). Dans les études bactériologiques, la mucine peut également servir de source nutritive comme décrit précédemment (Marsh 1995). Ainsi, l'ajout de 2,5 g/L de mucine permet de doubler la valeur du taux de croissance de *S. sanguis* en biofilm (Pratten et al. 1998b). L'addition d'urée est importante pour les études associant des microorganismes car certains d'entre eux, notamment les streptocoques oraux, sont capables de dégrader l'urée en dioxyde de carbone et ammoniac, ce qui affecte le pH du milieu.

Certaines salives artificielles contiennent également des vitamines et des acides aminés. Les salives n°5 et 8 contiennent chacune de la cystéine et la vitamine K, tandis que la salive n°6 ne contient que de la vitamine K. La cystéine est probablement utilisée pour ses propriétés antioxydantes. La vitamine K est un facteur de croissance pour plusieurs espèces bactériennes orales, notamment *Bifidobacterium* (Hojo et al. 1987) et *Porphyromonas gingivalis* (Wyss 1992). De façon plus complexe, Shellis (1978) ont introduit dans leur salive artificielle un mélange de neuf vitamines (thiamine, riboflavine, acide folique, acide pantothénique, acide nicotinique, pyridoxine, biotine, vitamine B12 et vitamine K) et de 16 acides aminés (alanine, arginine, asparagine, glutamate, glycine, histidine, leucine, isoleucine, lysine, méthionine, proline, serine, phénylalanine, thréonine, tyrosine, valine). Cette composition de salive permet de cultiver efficacement les microorganismes de la plaque dentaire, mais s'éloigne de la composition de la salive naturelle.

Selon les auteurs, des enzymes sont également ajoutées dans certaines salives artificielles. Ainsi, l' $\alpha$ -amylase est présente dans les salives artificielles dont l'objectif est de modéliser la première étape du processus de digestion (salives n°2 et 3). Pour les études bactériologiques, seuls Shellis (1978) ont intégré l' $\alpha$ -amylase dans leur composition salivaire (salive n°4), lors de cultures continues de la plaque dentaire. Le lysozyme est présent dans une salive artificielle (salive n°3), afin d'étudier la persistance du pathogène *E. coli* O157:H7 au cours de la digestion (Naim et al.

2004). Ainsi, mises à part ces deux études, les enzymes sont très peu considérées dans les salives artificielles utilisées comme milieux de culture.

Au-delà des références citées dans le Tableau 7, il existe d'autres salives artificielles, dont la composition est proche de celles décrites précédemment. Ainsi, Monoi et al. (2004) utilisent une composition similaire à celle de McBain et al. (2003), mais avec 0,5 g/L de KCl et 3 g/L de peptone. Hope and Wilson (2004) utilisent la salive n°7 (Pratten et al. 1998b), mais sans urée.

#### ***II.3.2.4 Complémentation des salives artificielles par des éléments nutritifs***

L'ajout de composés nutritifs dans les salives artificielles est nécessaire dès lors que la croissance bactérienne est étudiée. Ces composés nutritifs peuvent être intégrés dans le milieu salive artificielle dès le départ, ou alors être apportés ultérieurement de façon séquentielle, pour mimer la dynamique de l'apport de nutriments dans la bouche.

De nombreux auteurs supplémentent la salive artificielle avec des extraits de levure et de viande, des peptones et parfois des sucres (salives n°6, 7 et 8). Ainsi, la salive n°7 contient plusieurs sources d'azote (peptone, extrait de levure et de viande), ce qui permet d'obtenir un taux de croissance pour *S. sanguis* de 0,8 h<sup>-1</sup> au lieu de 0,06 h<sup>-1</sup> en l'absence de ces composés azotés (Pratten et al. 1998b). McDermid et al. (1987) utilisent aussi la composition de la salive n°7, en la supplémentant avec 14 mM de saccharose. Enfin, Saunders et al. (2000) reprennent la composition salivaire proposée par Shellis (1978) en lui ajoutant 2 g/L de glucose.

Lorsque la salive artificielle n'est pas complétement dès le départ, les microbiologistes ajoutent des nutriments de façon intermittente, afin de mimer un apport se rapprochant des conditions buccales. Ainsi, McBain et al. (2003) contrôlent la croissance d'un biofilm oral par l'introduction, quatre fois par jour pendant 30 min, d'une solution nutritive constituée d'amidon, de caséine, de saccharose et d'extrait de levure. Des ajouts de glucose, une fois par jour (Bradshaw et al. 2002), ou de saccharose deux fois par jour (Monoi et al. 2004) sont également réalisés pour induire la croissance de neuf et cinq espèces orales, respectivement (dont *S. mutans*, *S. sanguis* et *Actinomyces naeslundii* communs dans les deux études). Une étude a comparé la croissance d'un biofilm de plaque dentaire dans son milieu naturel et dans la salive artificielle n°7 complétement par du saccharose trois fois par jour (Sissons et al. 1991). Elle conclut à une croissance similaire en termes de structure du biofilm, de composition microbienne, de taux de croissance et d'évolution du pH, en salive artificielle et en milieu naturel.

Finalement, de nombreux milieux de culture ont été développés pour l'étude des bactéries orales, en remplacement de la salive naturelle, trop variable pour permettre une bonne reproductibilité. Les milieux de cultures traditionnels sont préférés pour des études préliminaires ou sur des fonctionnalités biologiques précises. En revanche, les travaux portant sur l'effet des conditions buccales utilisent des salives artificielles. La composition de ces dernières varie selon les auteurs et l'objectif de l'étude. Malgré leur simplification, certaines salives artificielles complémentées simulent bien les conditions rencontrées par les microorganismes dans la bouche.

### **II.3.3 Les applications des salives artificielles et des bioréacteurs associés**

Le développement des salives artificielles et des bioréacteurs adaptés permet de reproduire des conditions proches de celles de la cavité buccale. Ces conditions sont utilisées dans des travaux basés sur différents types d'écosystèmes bactériens (cultures pures, consortia, microcosmes), pour observer les réponses physiologiques des microorganismes soumis à différents traitements (régime sucré, agents antimicrobiens...).

#### ***II.3.3.1 Application des salives artificielles à l'étude de différents écosystèmes microbiens de la bouche***

En fonction de la problématique de recherche, trois types d'écosystèmes bactériens sont étudiés, dans des conditions mimant celles de la cavité buccale : des cultures pures, des consortia reconstitués de composition définie, et des écosystèmes réels appelés aussi microcosmes.

Les cultures pures sont principalement utilisées afin d'étudier les fonctionnalités biologiques et les réponses spécifiques d'une espèce bactérienne orale (McBain 2009). Si de nombreuses études existent dans des milieux de cultures riches traditionnels (Samot et al. 2011; Kaci et al. 2011), les travaux en salive artificielle sont peu nombreux. Ils traitent principalement de l'effet de traitements antibactériens sur la survie bactérienne et la formation de biofilm oraux (*S. mutans* (Zanin et al. 2005; Zampatti et al. 1994), *S. sanguis* (Pratten et al. 1998b).

La majeure partie des travaux utilisant des salives artificielles s'intéresse aux écosystèmes des dents (Bradshaw et al. 1996b; Bradshaw et al. 1994; McDermid et al. 1987) et de la langue (Pratten et al. 2003). S'appuyant sur des écosystèmes définis et simplifiés, ils permettent d'étudier les interactions bactériennes ainsi que les interactions avec l'hôte, avec une bonne reproductibilité des résultats (McBain 2009). Deux principaux consortia existent. Le consortium dit de « Marsh » est composé de 10 bactéries qui représentent les principaux groupes bactériens de la bouche : *S. mutans*, *S. gordonii*, *S. oralis*, *Lactobacillus casei*, *Actinomyces naeslundii*,

*Neisseria subflava*, *Veillonella dispar*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella nigrescens* et *Fusobacterium nucleatum* (Bradshaw et al. 1996a; Bradshaw et al. 1996b ; Bradshaw et al. 1994). Ce dernier a été utilisé pour démontrer la coopération métabolique qui opère entre les bactéries orales pour dégrader la mucine (Bradshaw et al. 1994), et pour étudier l'effet de l'aération sur l'équilibre inter-espèce (prédominance de *Neisseria subflava* et des trois streptocoques présents dans le consortium) (Bradshaw et al. 1996b). Le second consortium oral, créé par McKee et al. (1985), regroupe les 9 espèces suivantes : *S. mutans*, *S. sanguis*, *Abiotrophia* sp. (ex *S. mitior*), *Lactobacillus casei*, *Actinomyces viscosus*, *Neisseria* sp, *Veillonella alkalescens*, *Bacteroides intermedius* et *Fusobacterium nucleatum* (Bradshaw et al. 1989; McDermid et al. 1987). Les résultats des études utilisant ce consortium sont détaillés dans le paragraphe suivant (II.3.3.2). Malgré la complexité de ces consortia, les auteurs indiquent que l'extrapolation à un écosystème réel reste difficile, du fait de la simplification forte et de l'absence de nombreuses espèces (Marsh 1995).

A un stade plus complexe, certains auteurs ont inoculé des salives artificielles avec un microcosme, c'est-à-dire un échantillon bactérien directement prélevé dans une salive naturelle pour modéliser la plaque dentaire (Sissons et al. 2007; McBain et al. 2005; McBain et al. 2003), ou sur la langue (Pratten et al. 2003). La composition de ces microcosmes n'est pas connue en début d'expérimentation, mais peut être déterminée par des analyses génétiques (PCR et électrophorèse en gradient de gel dénaturant) (Sissons et al. 2007; McBain et al. 2003), ou des cultures sur milieux sélectifs (McBain et al. 2003; Pratten et al. 2003). L'avantage de cette approche est de maintenir la complexité et l'hétérogénéité de l'échantillon originel, mais au détriment d'une bonne reproductibilité des résultats (McBain 2009). De plus, la simulation de la plaque dentaire par un échantillon salivaire n'est pas exactement représentative de la flore du biofilm dentaire.

### ***II.3.3.2 Application des salives artificielles et des bioréacteurs associés pour des études physiologiques des microorganismes oraux***

Les modèles de simulation de la cavité buccale sont utilisés principalement dans deux types d'études : l'effet des régimes sucrés et l'action d'agents antibactériens.

Certains travaux portent sur les effets des régimes sucrés et de la chute de pH qui en découle sur les communautés bactériennes (Bradshaw et al. 2002; Bradshaw et al. 1989). Cette approche est permise grâce à l'introduction de mucine dans les milieux de culture. Ceci rend réaliste l'étude des comportements microbiens en dehors des périodes de « repas », en lien avec la dégradation

de cette glycoprotéine et son utilisation comme nutriment (Marsh 1995). Une coopération métabolique entre bactéries orales a notamment été démontrée pour parvenir à une dégradation complète de la mucine (Bradshaw et al. 1994). Grâce à cette approche, Bradshaw et al. (1989) ont montré que la croissance des bactéries cariogènes (*S. mutans* et *Lactobacillus casei*) est favorisée par la chute du pH consécutive à l'assimilation des sucres et à la production d'acide lactique par ces bactéries. McKee et al. (1985) révèlent, en outre, que les espèces *Bacteroides intermedius* et *Neisseria* sp. sont capables de se maintenir en conditions de glucose limitant, mais pas si il est en excès. Ceci pourrait s'expliquer par la concentration en acide organique deux fois plus importante et le pH plus acide en conditions d'excès en glucose.

Une autre approche intéressante porte sur l'étude de l'action d'agents antibactériens sur les bactéries pathogènes de la plaque dentaire, impliquées dans les caries ou les maladies parodontales (Pratten and Wilson 1999; Pratten et al. 1998b; McDermid et al. 1987). Pratten et al. (1998b) montrent que le triclosan (antibiotique et antifongique) et la chlorhexidine (antibiotique) diminuent significativement la viabilité de *S. sanguis* en biofilm. Le fait de travailler en culture continue permet, de plus, d'évaluer les effets de deux types de traitement : des injections uniques ou répétées d'agents antimicrobiens, et l'injection continue de petites quantités de ces molécules. Il a ainsi été démontré que l'administration continue de chlorhexidine permet d'éliminer toutes les bactéries de la culture (consortium de McKee) à l'exception de *Lactobacillus casei*, avec un taux de perte compris entre 0,15 et 0,5 logCFU/mL/h, tandis que les apports ponctuels ne permettent qu'une chute transitoire des concentrations bactériennes (Pratten and Wilson 1999; McDermid et al. 1987). Ces mêmes auteurs indiquent également que les effets d'apports ponctuels de chlorhexidine *in vitro* sur les communautés bactériennes sont proches de ceux observés lors d'études cliniques chez l'homme. Un travail a également été conduit sur l'effet d'un agent antibactérien physique, basé sur de la thérapie photodynamique (excitation d'un photosensibilisateur (présent dans le milieu de culture par une lumière de longueur d'onde de 630-640, ce qui va générer des composés cytotoxiques) (Zanin et al. 2005). Les auteurs concluent à une chute de la viabilité de *S. mutans* en biofilm de plus de 99,99% après 15 ou 30 min d'exposition à ce traitement.

Ces outils sont donc efficaces, à la fois pour étudier la physiologie des bactéries buccales, et pour sélectionner des agents microbiens actifs sur certaines bactéries orales.

### ***II.3.3.3 Applications des salives artificielles à l'étude in vitro de S. salivarius***

La plupart des travaux publiés à ce jour portent sur des bactéries pathogènes ou des écosystèmes buccaux complexes. En revanche, très peu d'études portent sur la bactérie buccale *S. salivarius*. Cette bactérie qui n'appartient pas à la plaque dentaire, n'est présente dans aucun consortium, et n'est pas répertoriée dans les cultures en microcosme, alors qu'elle est majoritaire dans la salive (Gibbons et al. 1964). Il n'existe donc pas, à notre connaissance, d'études sur le comportement de *S. salivarius* dans des conditions se rapprochant de celles de la bouche. Les seules études publiées en cultures continues sur *S. salivarius* ont été conduites en cultures pures et dans des milieux non salivaires (Li et al. 2000; Chen and Burne 1996; Derek et al. 1989). Deux d'entre elles s'intéressent au niveau d'activité uréasique de *S. salivarius* cultivé en biofilm (Li et al. 2000) ou en culture planctonique (Chen and Burne 1996). Elles sont toutes les deux réalisées dans un milieu constitué de peptones, d'extraits de levure, et de sucres, bien loin de la composition de la salive. Une dernière étude s'intéresse aux effets du taux de dilution en culture continue (de 0,1 à 1,1 h<sup>-1</sup>) sur les propriétés de surface de *S. salivarius* et sa capacité de co-agrégation avec *Veillonella parvula* dans un milieu chimiquement défini contenant du glucose, des acides aminés, des vitamines et de nombreux ions. Ce milieu pourrait se rapprocher d'une salive artificielle, même si les sels minéraux présents ne sont pas tous retrouvés dans les compositions classiques de salives artificielles. Ce milieu ne contient pas non plus de mucine, d'urée et d'enzymes (Derek et al. 1989).

Finalement, les connaissances sur l'impact des conditions buccales sur cette bactérie commensale sont encore très limitées, et méritent d'être approfondies.

## **II.4 Synthèse des informations**

Contrairement à de nombreux streptocoques, *S. salivarius* qui est présent majoritairement dans la salive et sur le dos de la langue, n'est pas un pathogène buccale. Au contraire, cette espèce présente des propriétés bénéfiques via trois phénomènes : un effet anti-inflammatoire sur les cellules hôtes, la production de bactériocines, et une forte capacité d'adhésion aux muqueuses linguales. L'administration de la souche commerciale K12 démontre des effets contre les affections respiratoires dues à *S. pyogenes*, mais également contre l'halitose. Cependant, si des résultats sont observés à court termes, la colonisation de la bouche par cette souche et les effets bénéfiques s'estompent rapidement à la fin du traitement. Ce phénomène pourrait être lié à

l'environnement buccal, qui influe probablement sur *S. salivarius*. Mais ce domaine est encore actuellement très peu renseigné.

La bouche est en effet un milieu complexe, où de nombreux facteurs peuvent influencer le développement des bactéries buccales. Les variations de pH et du potentiel d'oxydoréduction en sont des exemples, puisque les bactéries y sont particulièrement sensibles. Pour résister à ces stress, *S. salivarius* produit des enzymes dégradant l'oxygène, et consomme l'urée présente dans la salive pour produire un composé alcalin. De plus, la bouche est baignée par la salive, qui contient de nombreux composés susceptibles d'interférer avec les bactéries buccales. Certains ont une action antimicrobienne directe (immunité spécifique, enzyme antibactérienne), tandis que d'autres molécules vont agréger les bactéries et ainsi faciliter leur clairance lors de la déglutition. Un autre phénomène essentiel dans la cavité buccale est l'alternance de périodes de repas et de périodes de manque nutritionnel, dépendantes du comportement alimentaire de l'hôte. Pour s'adapter aux périodes de carences nutritionnelles, les bactéries buccales ont mis en place plusieurs stratégies. On peut citer l'utilisation préférentielle de systèmes de transport nécessitant moins d'énergie, la synthèse de réserves énergétiques et l'utilisation de sources de sucres alternatives.

Des systèmes de bouches artificielles ont déjà été développés pour l'étude du comportement des bactéries pathogènes buccales (caries et maladies parodontales). La gamme de ces systèmes est très large et permet des études en conditions planctoniques et en biofilms, en batch ou culture continue, avec parfois des apports discontinus de nutriments. Les milieux de cultures utilisés dans ces systèmes sont plus ou moins représentatifs de la salive humaine dans leur composition ionique. En revanche, leur composition protéique et enzymatique est souvent éloignée de celle de la salive réelle. Ces bouches artificielles sont principalement utilisées sur des cultures mixtes pour imiter et comprendre le développement de la plaque dentaire et tester l'effet d'agents antimicrobiens.

Notre étude s'inscrit dans ce contexte. En utilisant différentes méthodes d'analyse, et en combinant plusieurs niveaux d'études, ce travail a pour but une meilleure compréhension des phénomènes physiologiques se produisant lors de la croissance et la maintenance de *S. salivarius* K12 dans son environnement naturel. Le comportement de cette bactérie, peu étudiée d'un point de vue métabolique, sera caractérisé dans une salive artificielle. Cette salive sera ensuite enrichie de plusieurs enzymes salivaires et le milieu de culture sera aéré afin de déterminer l'impact de ces facteurs buccaux. L'apport de saccharose sera également testé. Enfin, une culture continue respectant les cycles du flux salivaire, et alimentée périodiquement par une solution nutritive



permettra de se rapprocher des dynamiques buccales, et d'étudier l'effet de ces conditions sur *S. salivarius* K12.

## III. Matériels et méthodes

### III.1 Microorganismes et précultures

Le travail réalisé au cours de cette thèse a porté sur la souche *Streptococcus salivarius* K12, qui a été choisie pour ses aspects probiotiques (Burton et al. 2006a; Tagg et al. 2009) et son innocuité (Burton et al. 2006b), (Burton et al. 2010). Cette souche a été fournie par la société BLIS technologies (Dunedin, Nouvelle-Zélande), sous forme de comprimés lyophilisés (BLIS<sup>K12</sup> throat guard), contenant  $1 \cdot 10^9$  CFU/comprimé. En outre, sa bonne reproductibilité en fermentation en fait un bon modèle d'étude.

Des cryotubes stocks ont été réalisés à partir de cultures en milieu M17 (Biokar Diagnostic, Beauvais) additionné de 15 g/L de glucose (VWR, Strasbourg) et inoculé avec les comprimés. Après incubation de 24 h à 37°C et addition de glycérol 15%, la souche est stockée sous forme congelée à -80 °C.

Avant inoculation en fermenteur, deux précultures successives de 24 h puis 15 h sont réalisées en bouillon M17, à 37 °C. L'ensemencement du fermenteur est réalisé à une concentration initiale de  $1 \cdot 10^6 \pm 1 \cdot 10^5$  CFU/mL. Ce taux d'ensemencement est 1 log inférieur à la concentration de *S. salivarius* dans la salive humaine ( $1 \cdot 10^7$  CFU/mL).

### III.2 Milieux « salive artificielle » et « salive artificielle complémentée »

Le milieu salive artificielle a été créé en s'appuyant sur l'étude bibliographique de la salive humaine (Tableau 5). L'objectif visé était de reproduire le plus fidèlement possible sa composition ionique ainsi que son pH. Sa concentration en protéines totales devait également être représentative de celle de la salive humaine. Toutefois, par souci de simplification et parce qu'elle est majoritaire en salive naturelle, la seule protéine apportée dans le milieu est de la mucine (extraite d'estomac de porc, Sigma-Aldrich, Lyon), à une concentration de 2 g/L, en accord avec de nombreux auteurs. La salive contient en outre de l'urée (VWR), qui est ajoutée dans le milieu à une concentration de 0,2 g/L.

Afin de respecter les concentrations ioniques trouvées dans la salive humaine, une liste de composés pouvant être utilisés a été établie :  $K_2HPO_4$  ; KCl ;  $CaCl_2$  ; NaCl ;  $NaHCO_3$  ;  $KH_2PO_4$  ;

MgCl<sub>2</sub> ; KHCO<sub>3</sub> ; NaNO<sub>3</sub> ; CaCO<sub>3</sub> ; NH<sub>4</sub>Cl ; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Les composés et les concentrations ioniques souhaitées ont ensuite été mis en équation, à l'aide du tableau suivant :

Tableau 8 : Mise en équation des composés ioniques de la salive

Composé	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	KCl	CaCl <sub>2</sub>	NaCl	NaHCO <sub>3</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	MgCl <sub>2</sub>	KHCO <sub>3</sub>	NaNO <sub>3</sub>	CaCO <sub>3</sub>	NH <sub>4</sub> Cl	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Conc
Variable	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11	X12	totale
Na <sup>+</sup>				1	1				1			2	4,35
K <sup>+</sup>	2	1				1		1					21,74
Ca <sup>2+</sup>			1							1			1,25
Cl <sup>-</sup>		1	2	1			2				1		23,94
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>					1			1					4,92
Pi	1					1						1	4,84
Mg <sup>2+</sup>							1						0,41

X1..X12 : Nom de variable pour chaque composé ; conc totale : Concentration souhaitée pour chacun des ions

Par exemple, pour obtenir la concentration finale souhaitée en ion Na<sup>+</sup> (4,35 mM), les quatre molécules qui en contiennent (NaCl ; NaHCO<sub>3</sub> ; NaNO<sub>3</sub> ; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) sont associées pour former l'équation suivante :

$$\text{POUR NA}^+ \quad x4 + x5 + x9 + 2 \cdot x12 = 4,35$$

Où xi est la concentration de chaque molécule en mM

Pour chaque ion, l'équation caractéristique a été créée selon le même principe, en lui associant la concentration finale souhaitée :

$$\text{POUR NA}^+ \quad x4 + x5 + x9 + 2 \cdot x12 = 4,35$$

$$\text{POUR K}^+ \quad 2 \cdot x1 + x2 + x6 + x8 = 21,74$$

$$\text{POUR CA}^{2+} \quad x3 + x10 = 1,25$$

$$\text{POUR CL}^- \quad x2 + 2 \cdot x3 + x4 + 2 \cdot x7 + x11 = 23,94$$

$$\text{POUR HCO}_3^- \quad x5 + x8 = 4,92$$

$$\text{POUR PI} \quad x1 + x6 + x12 = 4,84$$

$$\text{POUR MG}^{2+} \quad x7 = 0,41$$

Ce système comporte 7 équations et 12 inconnues. La réponse possible est donc multiple. Cependant, on peut réduire le nombre d'inconnues en réduisant le nombre de composés utilisés, et en considérant qu'il faut au minimum un composé pour chaque ion. La liste initiale de composés ioniques est alors réduite à sept éléments : KCl ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; MgCl<sub>2</sub> ; KHCO<sub>3</sub> ; NaNO<sub>3</sub> ; NH<sub>4</sub>Cl ; CaCO<sub>3</sub>. On obtient alors un système de 7 équations à 7 inconnues dont la résolution permet de définir les valeurs des concentrations des composés ioniques. En considérant ces

valeurs, il est alors possible d'établir la composition suivante de la salive artificielle qui sera utilisée dans cette étude :

*Tableau 9 : Composition de la salive artificielle*

Composés	Concentration (g/L)	Fournisseurs
KCl	0,894	VWR, Strasbourg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,659	VWR
MgCl <sub>2</sub>	0,083	Sigma Aldrich, Lyon
KHCO <sub>3</sub>	0,492	Alfa Aesar, Schiltigheim
NaNO <sub>3</sub>	0,370	VWR
NH <sub>4</sub> Cl	0,596	Sigma Aldrich
CaCO <sub>3</sub>	0,125	VWR
Urée	0,200	VWR
Mucine	2,000	Sigma Aldrich (mucine d'estomac de porc, type III)

Afin de mimer un « repas » et de permettre la croissance bactérienne, cette salive artificielle doit être complétée avec une solution nutritive composée de 5 g/L de D(+) glucose (Merck, Fontenay-sous-Bois) et de 1,4 g/L d'extrait de viande (Biokar Diagnostic). La quantité de glucose choisie est utilisée par d'autres auteurs pour représenter un repas dans une salive artificielle (Chen and Burne 1996; Bradshaw et al. 1989; Basson 2000). A partir de données nutritionnelles, nous avons calculé le rapport entre la consommation quotidienne de glucides (290 g/jour) pour un adulte de 60 kg avec une activité physique modérée (Hark and Deen 2005), et la quantité de glucose introduite dans les cultures orales (5 g/L). Ce rapport a ensuite été appliqué sur la consommation quotidienne de protéines (80 g/jour) (Hark and Deen 2005) pour en déduire la quantité d'extrait de viande à apporter dans le milieu de culture (1,4 g/L). Glucose et extrait de viande sont préparés ensemble et forment la solution nutritive. Le milieu composé de la salive artificielle et de la solution nutritive est dénommé « salive artificielle complétée » ou milieu CAS.

### **III.3 Conduite des fermentations**

#### **III.3.1 Fermentations en batch**

##### *III.3.1.1 Equipements utilisés*

Les fermentations en batch sont réalisées dans un bioréacteur de 2,2 L (LSL-Biolafitte, Malize) avec un volume utile de 1,9 L. Le fermenteur est équipé d'un moteur d'agitation tournant à 150 rpm, et d'une sonde stérilisable mesurant la température, le pH et le potentiel redox (ISM LnPro 3256i/SG/325, Mettler Toledo, Bussigny, Suisse), reliée à un ordinateur comprenant un logiciel

d'acquisition de données (WCidus, INRA, Grignon). Au cours de la fermentation, la température est régulée à  $37 \pm 1$  °C (température moyenne de la cavité buccale) grâce à une double-enveloppe dans laquelle circule de l'eau maintenue à la température de consigne. Le pH est contrôlé à pH 6,7 (valeur moyenne du pH de la cavité buccale) par ajout automatique d'une solution d'hydroxyde de potassium (2 N) à l'aide d'une pompe péristaltique. Les paramètres contrôlés, ainsi que le potentiel redox et la masse de KOH apportée dans le fermenteur sont mesurés tout au long des fermentations.

### ***III.3.1.2 Suivi des fermentations***

La fermentation démarre au moment de l'inoculation (1 mL/L) couplée à un éventuel ajout de solution nutritive dans le cas d'une fermentation en milieu CAS. Le suivi des fermentations est effectué grâce au logiciel WCidus, par la mesure en ligne du potentiel redox et de la masse de KOH utilisée pour maintenir le pH constant (permettant le calcul de la concentration en KOH (g/L) dans le fermenteur). Le calcul en temps réel de la vitesse de consommation de KOH (g/L/min) permet de suivre le déroulement des cultures et de déterminer la vitesse maximale de consommation de KOH, utile pour comparer les fermentations entre elles et évaluer leur reproductibilité.

Pour mesurer la croissance et l'état physiologique au cours de la fermentation, des prélèvements sont effectués toutes les heures pendant la croissance jusqu'au début de la phase stationnaire (9 h) puis après 25 h de fermentation.

### ***III.3.1.3 Plans d'expériences***

Deux plans d'expériences sont réalisés en cultures discontinues.

L'objectif du premier plan d'expériences est de caractériser la croissance et la maintenance de *S. salivarius* K12 en milieu CAS. Dans ce but, des fermentations comparatives sont réalisées en milieu M17 (Biokar Diagnostic) et en milieu CAS (composition en annexe 1). Des cultures complémentaires sont conduites dans un milieu mixte (MM), associant les composants du milieu M17 et ceux du milieu « salive artificielle » (annexe 1). Pour les cultures en milieux M17 et MM, l'inoculation n'est pas accompagnée d'une addition de solution nutritive, le M17 contenant déjà les substrats pour la croissance bactérienne.

Le second plan d'expériences a pour objectif d'étudier l'effet de certains facteurs environnementaux sur la croissance et la maintenance de *S. salivarius* K12 en milieu CAS. Les

effets de l'addition de trois enzymes habituellement présentes en salive naturelle, la peroxydase (avec son substrat, le KSCN), le lysozyme et l'amylase, ont été testés. En outre, l'influence de l'ajout de saccharose à deux concentrations et d'une injection d'air enrichi en dioxyde de carbone à hauteur de 5%, correspondant à de l'air « expiré » a également été évaluée. Les concentrations retenues pour les apports d'enzymes et de saccharose sont présentées au Tableau 10, ainsi que le débit de gaz utilisé.

Tableau 10 : Conditions relatives aux facteurs environnementaux testés

Composés	Concentration	Fournisseurs
Amylase	300 U/ml	Sigma Aldrich (Lyon)
Lysozyme	700 U/ml	VWR (Strasbourg)
Peroxydase (+ KSCN)	0,8 mU/mL (1 mM)	VWR et Alfa Aesar (Schiltigheim)
Air à 5% CO <sub>2</sub> , 80% N, 15% O <sub>2</sub>	6 L/h	Air liquide (Paris)
Saccharose	1,25 et 12,5 g/L	Sigma Aldrich

### III.3.2 Fermentations continues

#### III.3.2.1 Equipements utilisés

Les fermentations en continu de *S. salivarius* K12 sont réalisées dans un bioréacteur BIOSTAT® Aplus de 5 L (SARTORIUS STEDIM, Aubagne). Le fermenteur est équipé d'un moteur d'agitation tournant à 80 rpm et d'une sonde de pH stérilisable (Easyferm K8 325, Hamilton, Bonaduz, Suisse), reliée à un logiciel de suivi en ligne (MFCS/DA, SARTORIUS STEDIM). Au cours de la fermentation, la température est régulée à  $37 \pm 1$  °C par un manteau chauffant et une circulation d'eau froide dans une gaine située à l'intérieur du fermenteur. Le pH est régulé à pH 6,7 par ajout automatique d'une solution d'hydroxyde de potassium (2 N) ou d'acide sulfurique (1%) à l'aide de pompes péristaltiques. L'injection continue d'un gaz composé de 80% d'azote, de 15 % d'oxygène et de 5% de dioxyde de carbone, à un débit contrôlé de 6 L/h est permise grâce au logiciel WCidus.

La culture continue implique un apport de milieu de culture stérile (salive artificielle et milieu nutritif) et un soutirage du milieu fermenté. Le milieu de culture « salive artificielle » est délivré selon un profil contrôlé par le logiciel micro DCU System (Sartorius Stedim). Afin de maintenir le volume de milieu dans le fermenteur à 1,5 L, une sonde de niveau stérilisable est introduite dans le fermenteur. Le contact entre cette dernière et le milieu de culture déclenche une pompe péristaltique qui soutire le milieu de fermentation jusqu'à ce que la sonde de niveau et le milieu de culture ne soient plus en contact. Un système indépendant constitué d'une pompe péristaltique

connectée à un minuteur (Schneider Merlin Gerin CCT15853, RS Components, Beauvais) permet la délivrance programmée de la solution nutritive, à des instants et sur des durées préétablies.

### III.3.2.2 Déroulement des fermentations continues

La fermentation démarre au moment de l'inoculation (1 mL/L). Celle-ci est couplée à un premier ajout de solution nutritive pendant 30 min à un débit constant de 1 mL/min. Le pH est maintenu à pH 6,7 et une injection d'« air expiré » est effectuée à un débit de 6 L/h. Au cours des 4 premières heures, la fermentation se déroule en mode batch, sans apport de milieu salive. Cette première phase permet à *S. salivarius* K12 de démarrer sa croissance et d'atteindre un niveau de biomasse suffisant ( $1,4 \pm 0,6 \cdot 10^8$  CFU/mL). Ensuite, la pompe d'alimentation en salive artificielle est mise en route et la fermentation évolue en culture continue, selon les profils prédéterminés d'apports de salive artificielle et de solution nutritive (Figure 10).

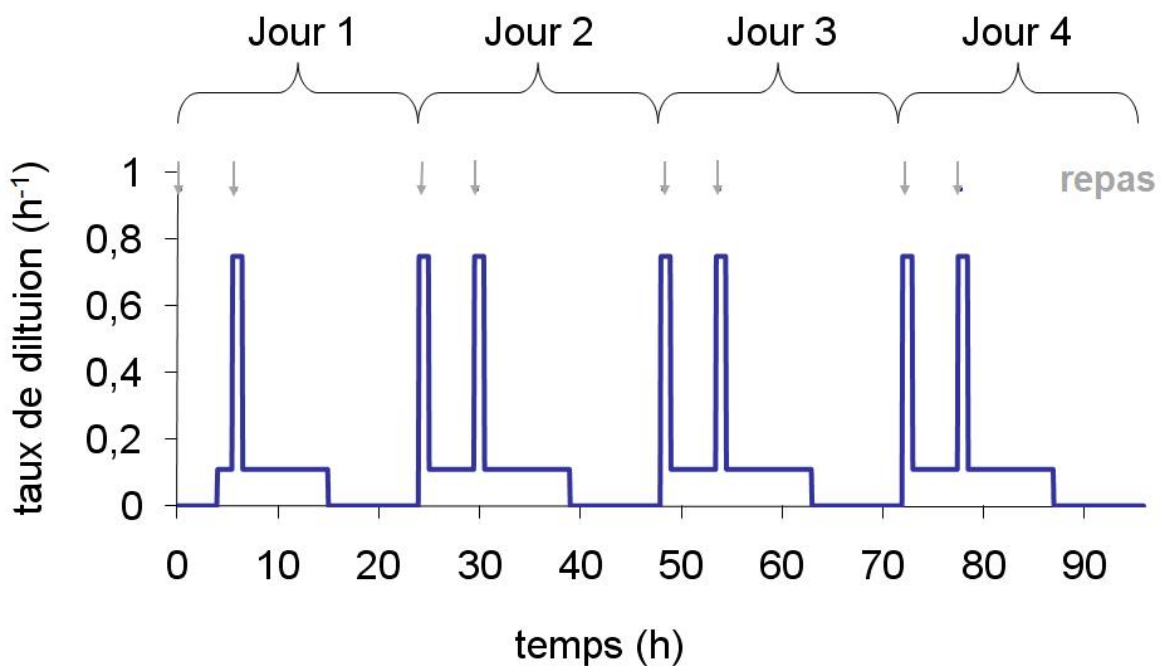


Figure 10 : Evolution du taux de dilution lié au débit de salive et à l'ajout de solution nutritive lors des cultures continues

Les débits de salive artificielle délivrée au cours d'une journée ont été choisis pour être représentatifs des conditions buccales humaines, à partir des valeurs habituellement utilisées dans la littérature (Bradshaw et al. 2002; Van der Hoeven and Camp 1991; Saunders et al. 2000; Hamilton et al. 1985). Ainsi, lors du sommeil, le flux salivaire est quasiment nul ; il est donc fixé à 0 mL/min dans ce travail, pendant une période quotidienne de 9 h (de 0 h à 9 h du matin). Au

cours de la journée, deux flux salivaires différents sont identifiés : le flux de salive stimulée (SWS ou « stimulated whole saliva », 2 mL/min) et celui de salive non stimulée (UWS ou « unstimulated whole saliva », 0,3 mL/min). Les taux de dilution buccaux, calculés à partir du volume de la cavité buccale (160 cm<sup>3</sup> (Lida-Kondo et al. 2006)) et de ces flux salivaires ont permis de déterminer des taux de dilution de 0,11 h<sup>-1</sup> en salive non stimulée et de 0,75 h<sup>-1</sup> lors des périodes de salive stimulée. En retour, ces taux de dilutions ont permis de calculer les flux salivaires adaptés au volume de fermentation (1,5 L), comme présenté dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Taux de dilution et débits utilisés en culture continue en fonction du type de salive

Période de la journée	Type de salive	Débit réel dans la cavité buccale (mL/min)	Taux de dilution (h <sup>-1</sup> )	Débit réel dans un fermenteur de 1,5 L (L/h)
Repos	UWS	0,3	0,11	0,17
Repas	SWS	2	0,75	1,13
Sommeil	absence	0	0	0,00

UWS : salive non stimulée ; SWS : salive stimulée

Au cours de l'étude, deux apports journaliers de solution nutritive ont été effectués. Conformément à la Figure 10, la solution nutritive est apportée à raison de 2 fois 30 min par jour (de 0 à 0,5 h et de 5,5 h à 6 h de culture (soit entre 9h et 9h30 puis de 14h30 à 15h00)) afin de mimer la délivrance des deux « repas ». Chaque apport est constitué d'un volume de 30 mL, à un débit de 1 mL/min, de façon à obtenir une quantité de substrat apporté équivalente à celle des fermentations discontinues. Au cours de ces apports, le flux salivaire correspond à celui de la salive stimulée. Le taux de dilution est fixé à 0,75 h<sup>-1</sup> au moment de chaque délivrance de solution nutritive, pendant 1 h après le début de chaque repas.

Entre les repas, le débit de salive est ralenti et correspond à celui de la salive non stimulée. Elle est délivrée à un taux de dilution de 0,11 h<sup>-1</sup> pendant deux périodes au cours de la journée : après le premier repas pendant 4,5 h (de 10h00 à 14h30), et après le second repas pendant 8,5 h (de 15h30 à 0h00). Ces taux de dilution sont en accord avec ceux utilisés dans d'autres travaux de microbiologie buccale (Bradshaw et al. 2002; Van der Hoeven and Camp 1991; Saunders et al. 2000; Hamilton et al. 1985).

### III.3.2.3 Suivi des fermentations

Grâce au logiciel MFCS/DA (Sartorius Stedim), les consommations de KOH et d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sont enregistrées et visualisées en temps réel. Les profils des fermentations sont ainsi établis et leur



reproductibilité est évaluée, notamment en fonction des descripteurs de consommation de KOH, et des résultats de cultivabilité.

Des analyses d'état physiologique et de cultivabilité sont réalisées en cours de fermentation, sur des prélèvements effectués toutes les 2 h lors de la phase batch puis toutes les 4 h au cours de la culture continue.

### **III.4 Analyses effectuées à l'échelle de la population**

#### **III.4.1 Analyse de la cultivabilité**

La concentration bactérienne des suspensions cellulaires est déterminée par dénombrement des colonies sur milieu gélosé sélectif M17 (Biokar Diagnostic), stérilisé 20 min à 115 °C. Les boîtes de Pétri sont incubées 24 h à 37 °C sous atmosphère anaérobie (GENbox anaer, BioMérieux, Marcy-l'Etoile). Les résultats sont exprimés en CFU/mL et correspondent à la moyenne d'au moins trois dénombrements.

#### **III.4.2 Analyse des constituants du milieu par HPLC**

Les concentrations en lactose, glucose et acide lactique sont déterminées à chaque point d'analyse au cours des fermentations, par chromatographie liquide haute performance (HPLC, Waters Associates, Millipore, Molsheim). Les suspensions cellulaires sont diluées au demi dans de l'acide trichloracétique (TCA 24 %, VWR) afin de précipiter les protéines. Après centrifugation à 1500 g pendant 20 min, les surnageants sont filtrés (0,22 µm), et conservés à -20 °C. Avant analyse, les filtrats sont dilués au demi dans de l'acide propionique 1 %, utilisé comme étalon interne.

Afin de séparer les composés carbonés, 20 µL d'échantillon sont injectés (injecteur automatique Waters 717 plus, Millipore, Molsheim) sur une colonne échangeuse de cations (colonne Aminex Ion Exclusion HPX-87H 300×7,8 mm, Biorad, Richmond, USA) maintenue à 35 °C (four thermostaté). Le débit de la phase mobile (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,005 M) est fixé à 0,6 mL/min grâce à une pompe (pompe LC-6A, Shimadzu, Courtaboeuf). Les composés sont détectés par réfractométrie (détecteur réfractométrique différentiel Waters 410, Millipore) et les résultats sont enregistrés et traités par le logiciel Millennium (Waters Associates). Les composés sont identifiés par leur temps de rétention. Les concentrations sont calculées, en tenant compte de l'étalon interne, à partir d'une gamme d'étalonnage réalisée avec une solution de référence contenant les molécules à quantifier.

### III.4.3 Analyse de l'activité bactériocine

#### III.4.3.1 Principe de la méthode

Au cours de cette étude, l'activité bactériocine est déterminée par la méthode « spot-on-lawn » (Hyun and Cheol 2000). Cette méthode consiste à inoculer en un point une gélose avec l'espèce productrice de bactériocine (ici, *S. salivarius* K12), puis de recouvrir cette gélose d'un tapis bactérien sensible à la bactériocine testée (ici, *Lb. sakei* ATCC 15521). Si le tapis bactérien est uniforme sur la boîte de Pétri, il n'y a pas d'activité bactériocine sur l'espèce cible. Par contre, si un halo d'inhibition se forme autour du point d'inoculation, cela démontre la présence d'une activité bactériocine.

#### III.4.3.2 Mise en œuvre

La souche test, *Lactobacillus sakei* ATCC 15521, a été choisie car c'est une souche non pathogène, très fréquemment utilisée pour la détection de différents types de bactériocines (Trmcic 2011).

Pratiquement, les milieux CAS, M17 et mixtes sont mélangés à 1,5% d'agar-agar (Biokar Diagnostic) pour former des géloses, puis stérilisés à 115 °C pendant 20 min. 20 mL de ces milieux sont coulés sur des boîtes de Pétri puis refroidis. Chaque boîte est ensuite inoculée par dépôt d'une goutte de 5 µL de *S. salivarius* K12 (préalablement cultivé 15 h en bouillon M17 à 37°C), au centre de la boîte de Pétri. Après incubation pendant 24 h à 37°C sous anaérobiose, les boîtes sont recouvertes par 4 mL de gélose MRS (Biokar Diagnostic) en fusion à 55°C, contenant 0,75% d'agar, 1% de Tween 80 (VWR) pour faciliter la diffusion de la bactériocine, et 2% d'une préculture de 24 h de *Lb. sakei* ATCC 15521. Les boîtes sont incubées à 25°C pendant 24 h pour permettre la formation du tapis bactérien.

Pour confirmer que l'inhibition observée est de nature protéique, le point d'inoculation de *S. salivarius* est recouvert d'une solution de 0,2 mg/mL de protéinase K (Sigma-Aldrich) à pH 7, sur une boîte de chaque milieu, juste avant de recouvrir la gélose avec le MRS contenant la souche test. L'absence de halo d'inhibition autour du dépôt enzymatique confirme la nature protéique de l'inhibition.

### **III.5 Analyses effectuées à l'échelle de la cellule individuelle par cytométrie en flux**

Différents paramètres de l'état physiologique des bactéries sont évalués au cours des fermentations, par épifluorescence couplée à la cytométrie de flux, selon les protocoles élaborés par Rault et al. (2007) et Rault et al. (2008). Les différents marqueurs fluorescents utilisés au cours de ce travail permettent d'évaluer :

- ✓ l'intégrité membranaire (marquage au PI) ;
- ✓ l'activité estérasique (marquage au cFDA) ;
- ✓ la dépolarisation de la membrane (marquage au DIBAC<sub>4</sub>(3)) ;
- ✓ la vitalité cellulaire (marquage au cFDA associé à une énergisation des cellules par ajout de glucose) ;
- ✓ le pH intracellulaire (marquage au cFDA-SE).

Avant marquage, les suspensions cellulaires sont diluées dans du tampon Mac Ilvaine (MI), composé d'acide citrique 0,1 M (Fisher Chemical, Elancourt) et de disodium dihydrogénophosphate 0,2 M (J.T. Baker, Deventer, NL) à pH 7,3. Ce tampon favorise la pénétration des marqueurs dans les cellules. La dilution est effectuée afin d'obtenir une concentration finale d'environ  $1 \cdot 10^6$  cellules/mL.

#### **III.5.1 Mesures de viabilité et de mortalité cellulaire**

Les fluorochromes diacétate de carboxyfluorescéine (cFDA) et iodure de propidium (PI) sont respectivement utilisés pour les mesures d'activité estérasique intracellulaire et d'intégrité membranaire. Le cFDA, molécule de petite taille, pénètre dans les cellules où il est clivé en carboxyfluorescéine, molécule fluorescente, sous l'action des estérases cellulaires. Le PI, de plus grande taille, ne pénètre que dans les cellules dont la membrane est altérée, et s'intègre aux acides nucléiques. La combinaison de ces deux fluorochromes permet de différencier, au sein d'une population, les cellules viables (activité estérasique et intégrité membranaire), des cellules mortes (pas d'activité estérasique ni d'intégrité membranaire) et des cellules altérées (activité estérasique mais plus d'intégrité membranaire).

Une solution diluée au  $1/10^6$  de cFDA est préparée à partir d'une solution commerciale (cFDA Chemchrome V8, AES Chemunex Inc, Ivry sur Seine), et conservée à -20 °C. La solution d'iodure de propidium (Sigma-Aldrich, Lyon) est préparée à 1 mg/mL (1,496 mM) dans de l'eau distillée et conservée à 4 °C. Le double marquage des cellules est réalisé en ajoutant 10 µL de

cFDA dilué au 1/10<sup>e</sup> et 5 µL de PI à 1 mL de suspension cellulaire préalablement diluée dans le tampon MI. Le mélange est incubé à 40 °C pendant 15 min, avant analyse au cytomètre en flux.

### **III.5.2 Mesure de dépolarisation membranaire**

Le fluorochrome bis (acide 1.3 dibutylbarbiturique) triméthine oxonol (DIBAC<sub>4</sub>(3)) est utilisé pour mesurer la dépolarisation membranaire (Ben Amor et al. 2002). Une solution diluée (0,05 mg/mL dans du diméthylsulfoxyde (Sigma-Aldrich)) est préparée à partir d'une solution commerciale (DIBAC<sub>4</sub>(3), 5 mg/mL, Invitrogen-Molecular Probes, Eragny-sur-Oise). Le marquage au DIBAC<sub>4</sub>(3) est combiné au marquage au PI pour différencier les cellules dépolarisées et ayant perdu leur intégrité membranaire des autres cellules. Les échantillons cellulaires préalablement dilués sont incubés avec 5 µL de PI (1,496 mM) et 5 µL de DIBAC<sub>4</sub>(3) (0,05 mg/mL) pendant 10 min à 40 °C avant analyse au cytomètre en flux (Rault et al. 2008).

### **III.5.3 Mesure de vitalité cellulaire**

La capacité des cellules à excréter la carboxyfluorescéine intracellulaire (cF) grâce à des transporteurs de type ABC (Konings 2006), après marquage au cFDA puis énérgisation des cellules par ajout de glucose, est associée à une mesure de la vitalité cellulaire (Bunthof et al. 2000).

Pratiquement, 5 µL de cFDA pur (cFDA Chemchrome V8, AES Chemunex Inc) sont ajoutés dans 2 tubes contenant chacun 1 mL de suspension cellulaire. Les mélanges sont incubés à 40 °C pendant 10 min puis centrifugés à 700 g pendant 1 min. Le culot cellulaire de chaque tube est ensuite repris dans 1 mL de tampon MI additionné de 100 mM de glucose. Le premier tube est directement analysé par cytométrie en flux, déterminant une intensité de fluorescence moyenne initiale (IF<sub>0</sub>). Le second tube est ré-incubé 10 min à 40 °C afin de permettre aux cellules d'excréter le cF avant une seconde analyse au cytomètre (IF<sub>10</sub>). L'efflux de cF représente la vitalité cellulaire : il est calculé comme la variation des intensités de fluorescence (ΔIF<sub>10</sub>, en %), selon l'équation suivante (Rault et al. 2008):

$$\Delta IF_{10} = [(IF_0 - IF_{10}) / IF_0] \cdot 100$$

### **III.5.4 Mesure du pH intracellulaire**

La détermination du pH intracellulaire (pHi) est réalisée par marquage des cellules avec le fluorochrome cFDA-SE (carboxyfluorescéine diacétate succinimidyl-ester), et mesure de l'intensité de fluorescence des cellules par cytométrie en flux (Rault et al. 2008). Une courbe de

calibration exprimant la relation entre l'intensité de fluorescence mesurée au cytomètre et le pH intracellulaire est réalisée en parallèle de chaque prélèvement. Elle est obtenue en équilibrant les cellules à un pH donné, par ajout de valinomycine, rendant la membrane plasmique perméable aux ions potassium, et de nigéricine, permettant l'échange des ions potassium et des protons. L'action combinée de ces deux composés dissipe la force proton-motrice et permet aux cellules d'équilibrer leur pHi avec le pH extracellulaire (Siegumfeldt et al. 2000).

Pour la réalisation de cette courbe étalon, les échantillons sont dilués dans le tampon MI pH 7,3 afin d'atteindre une concentration d'environ  $10^7$  cellules/mL. 5  $\mu$ L de cFDA-SE (8,96  $\mu$ M dans l'acétone, Invitrogen-Molecular Probes) sont ajoutés à 1 mL de suspension cellulaire diluée. Le mélange est incubé à 40 °C pendant 10 min. Les cellules ainsi marquées sont ensuite diluées au  $1/10^6$  dans des tampons MI de différents pH (pH 5,5, 6, 6,5, 7 et 7,3), additionnés de 5  $\mu$ L de valinomycine et de 5  $\mu$ L de nigéricine (Sigma Aldrich) (concentration finale de 1  $\mu$ M). Après 1 min d'incubation à température ambiante, l'intensité de fluorescence est mesurée par cytométrie en flux.

Les courbes étalons sont établies en reportant le logarithme de l'intensité de fluorescence moyenne de la population (log IF) en fonction du pH des cellules équilibrées, selon la Figure 11.

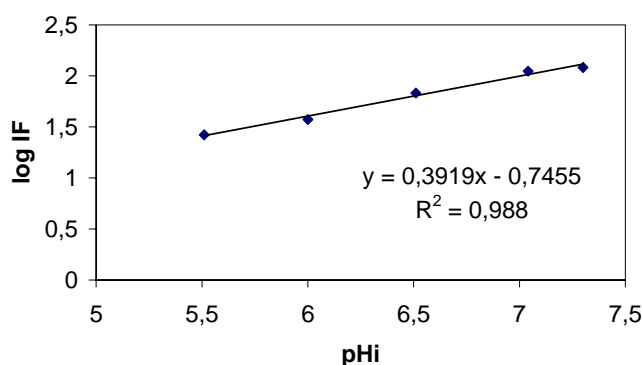


Figure 11 : Courbe de calibration type pour la mesure du pH intracellulaire d'un échantillon de *S. salivarius* K12 en milieu CAS

La mesure du pH intracellulaire de la suspension cellulaire est réalisée en parallèle de la gamme étalon, en utilisant le même protocole de marquage, mais sans équilibration du pHi avec le pH externe. Les cellules marquées sont diluées au  $1/10^6$  dans un tampon MI pH 6,7 puis analysées par cytométrie en flux. Le pH intracellulaire est déterminé à partir de l'intensité de fluorescence mesurée et de la courbe d'étalonnage.

### III.5.5 Analyse de la fluorescence par cytométrie en flux

Les mesures de fluorescence sont réalisées sur un cytomètre en flux de type Cyflow (AES-Chemunex). Celui-ci est équipé d'un système de comptage volumétrique qui permet de dénombrer les cellules dans un volume de 200  $\mu$ L, d'une source laser argon à 488 nm (bleu) et de quatre détecteurs (filtres passe-bande) dont les caractéristiques sont décrites ci-dessous :

- ✓ un détecteur FSC (forward-angle light scatter) qui détecte la lumière dans l'axe de la lumière incidente et informe sur la taille des cellules ;
- ✓ un détecteur SSC (side-angle light scatter) qui détecte la lumière à 90° par rapport à la lumière incidente et informe sur la granulosité des cellules ;
- ✓ 1 filtre passe bande ( $530 \pm 15$  nm) FL1 qui détecte la fluorescence verte ;
- ✓ 1 filtre passe haut ( $> 620$  nm) FL2 qui détecte la fluorescence rouge.

Les données de fluorescence sont collectées et analysées par le logiciel d'analyse Flowmax (Partec, Sainte-Geneviève-des-Bois), qui fournit des cytogrammes (courbes des nombres de cellules en fonction des intensités de fluorescence) et des tableaux statistiques recensant les nombres d'évènements comptés selon les différents types de marquage, ainsi que les pourcentages correspondants. Un réglage préalable des gains et de la compensation est nécessaire pour interpréter correctement les cytogrammes.

Les cellules marquées au cFDA, cFDA-SE et DIBAC<sub>4</sub>(3) fluorescent à des longueurs d'ondes de respectivement 517, 517 et 516 nm ; elles sont donc détectées en FL1. A l'inverse, les cellules marquées au PI fluorescent à 625 nm sont détectées en FL2. En conséquence, les résultats de vitalité cellulaire et de pH intracellulaire, correspondant à des marquages simples, sont tous deux interprétés à partir des mesures détectées en FL1. La Figure 12 donne, à titre d'exemple, une illustration des résultats obtenus à l'issue d'un simple marquage au cFDA. La région RN1 définit le nombre de cellules marquées.

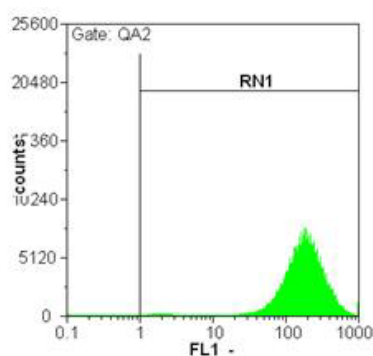


Figure 12 : Histogramme représentant le nombre de cellules en fonction de l'intensité de fluorescence verte (FL1), dans une suspension cellulaire de *S. salivarius* K12, marquée au cFDA

Les résultats de viabilité et mortalité d'une part, et de dépolarisation et mortalité d'autre part, correspondant tous deux à des doubles marquages, sont interprétés à partir des mesures effectuées aux deux longueurs d'onde. La Figure 13 illustre les résultats obtenus à l'issue d'un double marquage cFDA et PI. Les régions RN1 et RN2 définissent respectivement les nombres de cellules marquées au cFDA et au PI. Le troisième graphe correspond à un cytogramme biparamétrique et permet de représenter simultanément les intensités de fluorescence selon les deux longueurs d'onde. Sur ce graphe, les cellules situées dans le quadrant Q1 sont considérées comme mortes (elles ne fluorescent que dans le rouge, FL2). Les nombreuses cellules situées dans le quadrant Q4 sont considérées comme viables (elles ne fluorescent que dans le vert, FL1). Les cellules positionnées dans le quadrant Q2 sont marquées simultanément par le cFDA et le PI. Ces cellules sont considérées comme altérées puisqu'elles démontrent encore une activité estérasique alors que leur membrane n'est plus intègre. Enfin, dans le quadrant Q3 sont regroupées des particules qui ne fluorescent pas. Elles correspondent à des débris cellulaires.

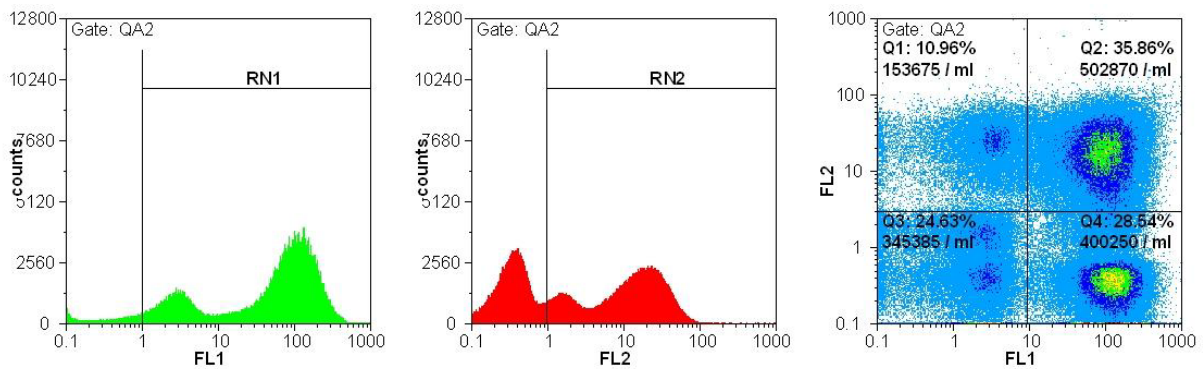


Figure 13 : Histogrammes et cytogramme biparamétrique représentant le nombre de cellules en fonction des intensités de fluorescence verte (FL1) et rouge (FL2) dans une suspension cellulaire de *S. salivarius* K12, marquée au cFDA et au PI

## **III.6 Analyse du protéome cytoplasmique**

L'analyse protéomique permet d'étudier l'ensemble des protéines présentes dans un échantillon biologique, dans des conditions et un état physiologique donnés. Elle s'effectue par électrophorèse bidimensionnelle qui permet de séparer les protéines sur un gel d'acrylamide, selon leur pH isoélectrique (pI) et leur poids moléculaire (PM). La méthode utilisée dans cette étude s'appuie sur le protocole décrit par Wang et al. (2005). Les protéines séparées sont ensuite quantifiées grâce à une analyse d'images et identifiées par la technique MALDI-TOF.

### **III.6.1 Récolte et stabilisation des cellules**

Les échantillons cellulaires (500 mL) sont récoltés en phase stationnaire, après 25 h de fermentation. Ils sont centrifugés 30 min à 1500 g et 4 °C (centrifugeuse Beckman, Villepinte). Les culots cellulaires d'environ 1,6 g sont congelés et conservés à -80 °C.

### **III.6.2 Extraction et purification des protéines**

Après décongélation, les culots cellulaires sont répartis dans des tubes (1 g par tube) puis lavés trois fois par centrifugation (9000 g, 30 min, 4 °C) dans 1 mL de tampon Tris 50 mM pH 8,8 (Biorad, Marnes la-Coquette). Les culots cellulaires (0,2 g) sont lysés par broyage dans 1 mL de tampon Tris-EDTA (50 mM – 1 mM, pH 8,8) (Sigma Aldrich) et 0,6 g de billes de broyage de 0,1 mm de diamètre (Biospec Products, Batlesville, USA). Ce mélange est broyé quatre fois pendant 30 secondes à l'aide d'un broyeur Bio101 (Savant Instruments, Holbrook, USA), à une vitesse de 6,5. Entre chaque broyage, l'échantillon est plongé pendant 5 min dans de l'eau glacée. Une centrifugation est ensuite effectuée (9000 g, 15 min, 4 °C) pour éliminer les cellules non broyées et les débris cellulaires. Le surnageant contenant les protéines solubles est congelé à -80 °C jusqu'à son utilisation.

Afin de normaliser la quantité de protéines qui sera déposée sur le gel lors de l'électrophorèse, la teneur en protéines extraites est déterminée par la méthode de Bradford, selon le protocole fourni avec le réactif « Coomassie protein assay reagent » (Pierce, Rockford, USA). Afin d'éliminer les composés cellulaires susceptibles d'interférer avec l'analyse protéomique, 0,2 µL (50 U) d'endonucléase (Biorad, Marnes-la-Coquette) et 0,2 µL de sulfate de magnésium 1 M (VWR) sont ajoutés à 300 µg de protéines afin d'éliminer les acides nucléiques. Après ajout d'acétone en excès, le mélange est homogénéisé par retournement, placé à -20 °C pendant 15 min, puis



centrifugé (8000 g, 12 min, 4 °C). Après l'élimination du surnageant, le culot protéique est séché par retournement sur du papier absorbant pendant 30 min.

### **III.6.3 Première dimension de l'électrophorèse 2D**

La première dimension s'effectue dans des bandelettes de gel d'acrylamide déshydraté (strips) selon un gradient de pH. Les protéines chargées (négativement ou positivement) se déplacent, sous l'action d'un champ électrique, pour atteindre leur point isoélectrique (pI). L'emploi d'agents de réduction, de détergents et d'ampholytes, inclus dans un tampon de focalisation isoélectrique, permet de solubiliser et d'ioniser les protéines.

Pratiquement, 300 µg de protéines purifiées sont solubilisées dans 360 µL de tampon de focalisation (annexe 2). La suspension protéique est déposée dans une rainure de la plaque de focalisation (Biorad), puis recouverte par un strip (IPG strip, Biorad) préalablement décongelé et couvrant une gamme de pH allant de 4 à 7. Le strip est recouvert d'huile minérale pour éviter l'évaporation, et déposé dans le portoir de focalisation (Protean IEF Cell, Biorad). La focalisation se déroule à 20 °C selon le programme présenté à l'annexe 3. Après une phase de réhydratation active sous faible voltage (50V) pendant 11 h, la focalisation est effectuée en augmentant la tension par paliers afin de limiter l'élévation de la température du strip. Le courant est maintenu à 8000 V pendant 7 h 30 min pour garantir une résolution et une séparation performantes des protéines. Le strip est ensuite rincé avec de l'eau milliQ, et conservé à -80 °C jusqu'à son utilisation en deuxième dimension.

Avant cette deuxième dimension, les protéines focalisées sur le strip sont solubilisées dans un tampon contenant du sodium dodecyl sulfate (SDS), afin d'établir des liaisons entre les protéines et le SDS. Pour cela, le strip est placé dans deux tampons successifs (annexe 4), à température ambiante et sous agitation :

- ✓ le tampon E1 pendant 15 min pour réduire les groupements sulfhydrates ;
- ✓ le tampon E2 pendant 20 min pour alcaliniser les groupements sulfhydrates.

Entre chaque bain, le strip est rincé avec de l'eau milliQ.

### **III.6.4 Deuxième dimension de l'électrophorèse 2D**

La seconde dimension consiste à séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire (PM). Le SDS, présent dans le gel d'acrylamide, est un agent anionique. Il se fixe sur les protéines et forme un complexe avec une charge nettement négative. Le gel d'acrylamide

fonctionne donc comme un tamis moléculaire : la migration d'une protéine sur le gel varie en fonction du poids moléculaire de la protéine et de la concentration en acrylamide.

Pratiquement, les gels d'acrylamide sont coulés entre deux plaques de verre, préalablement nettoyées à l'eau avec une solution de détergent (Alconox, Sigma-Aldrich). Elles sont rincées avec de l'eau milliQ, puis séchées sur du papier absorbant. Enfin, un nettoyage à l'alcool est effectué afin d'éliminer toutes traces d'humidité. Les plaques sont ensuite dressées sur un portoir.

Le gel est préparé selon la composition donnée à l'annexe 5. Juste avant de couler le gel entre les plaques, 250  $\mu$ L de persulfate d'ammonium (0,5 %) (Sigma-Aldrich) et 16  $\mu$ L de Temed (0,03 %) (Biorad) sont ajoutés pour catalyser la polymérisation. Un peigne est déposé à la surface du gel pour permettre le dépôt du strip et d'un marqueur de poids moléculaire.

Après la polymérisation (2 h à température ambiante), le strip est déposé en haut du gel, partie acide (+) vers la droite, ainsi que 200 ng d'un marqueur de poids moléculaire (Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Standards, 10–250 kD, Biorad). Le gel est déposé dans la cuve d'électrophorèse contenant environ 2 L de tampon de migration (annexe 5). Après un pré-run de 15 min à 5 mA pour stabiliser le gel, la migration se déroule à 14 °C pendant 16h30, selon le programme présenté à l'annexe 3.

A la suite de la migration, le gel est rincé dans de l'eau milliQ pendant 15 min, sous agitation douce. Les protéines sont ensuite colorées pendant 1 h dans du bleu de Coomassie colloïdal (Biorad). Le gel est ensuite rincé deux fois pendant 1 h, dans de l'eau milliQ, sous agitation.

### **III.6.5 Acquisition et analyse d'images**

Il est nécessaire de numériser le gel afin d'analyser les spots protéiques avec un système de traitement d'images. La numérisation est réalisée avec un scanner (GS800<sup>TM</sup>, Biorad), étalonné dans les gris. La Figure 14 montre, à titre d'exemple, un gel obtenu avec la souche *S. salivarius* K12, après culture en milieu CAS.

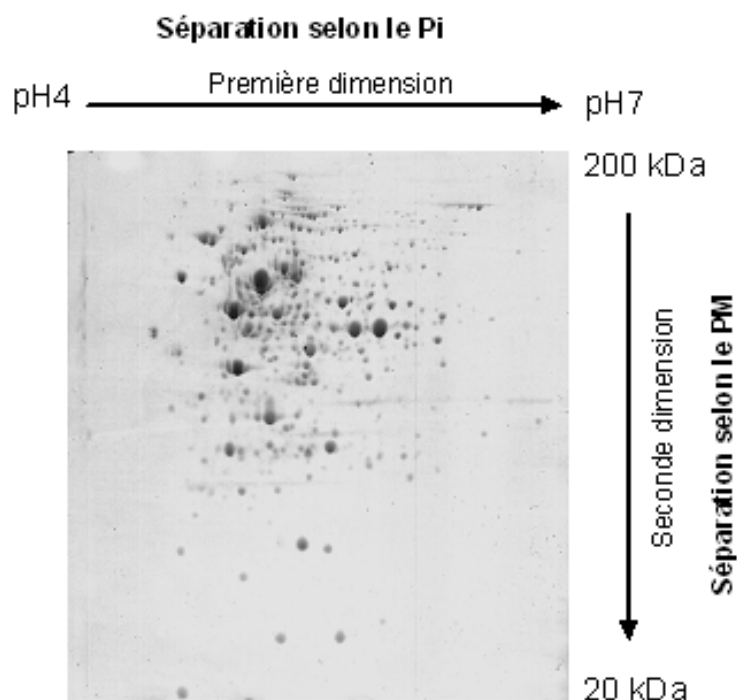


Figure 14 : Gel d'électrophorèse bidimensionnelle obtenu à partir d'un culot cellulaire de *S. salivarius* K12, prélevé en phase stationnaire en milieu CAS

L'analyse d'images est effectuée à l'aide du logiciel de traitement d'images PDQuest (Biorad), comme décrit par Wang et al. (2005). Ce logiciel permet d'identifier la position de chaque spot protéique, de quantifier son intensité, de comparer des spots entre eux et de faire des analyses statistiques. L'analyse d'images est réalisée en cinq étapes :

- ✓ Traitement primaire de l'image : alignement de l'image scannée, rognage des bords inutiles et augmentation des contrastes de l'image pour une meilleure visualisation des spots présents sur le gel et un amoindrissement du bruit de fond (l'intensité relative des spots entre eux ne varie pas) ;
- ✓ Détection des spots présents sur le gel par le logiciel ;
- ✓ Nettoyage: élimination des spots d'intensité trop faible pour être évalués correctement, ou situés dans des zones à fort bruit de fond ;
- ✓ Comparaison de trois gels obtenus dans la même condition : obtention d'une image représentative (gel de référence) de la condition étudiée, par sélection des spots communs sur chaque gel de comparaison, et création des points d'ancrage ;
- ✓ Détermination des coordonnées des spots, selon l'abscisse, en considérant que le pH du strip varie de façon linéaire. Un marqueur de poids moléculaire, inclus sur le gel, permet l'identification des masses des protéines (PM). Enfin, quatre spots de référence, correspondant à quatre protéines de PM et de pI connus, situés aux quatre extrémités

d'une image, permettent de déterminer les valeurs de poids moléculaire et de pI de tous les spots présents sur le gel et confirment les coordonnées établies.

Pour comparer des gels issus de deux conditions expérimentales différentes, un « matchset » est constitué à partir des gels correspondants aux deux conditions. Les gels sont comparés en fonction des niveaux de gris et des surfaces de chaque spot, en déterminant 3 variables :

- ✓ IL1 : (Intensity Level) expression relative qui renseigne sur la surface et l'intensité de gris d'un spot dans les gels de référence ;
- ✓ IL2 : (Intensity Level) expression relative qui renseigne sur la surface et l'intensité de gris d'un spot dans les gels de comparaison ;
- ✓ MF : (Modifying Factor) expression différentielle, correspondant au rapport des IL du même spot dans les deux séries de gels comparés :  $MF = IL2/IL1$ .

Quatre types d'analyses sont alors effectués afin de quantifier les éventuelles différences entre deux gels :

- ✓ une analyse statistique (test de Student) pour identifier les spots statistiquement différents dans les deux séries de gel, en tenant compte de la variabilité entre les gels ;
- ✓ une analyse qualitative qui permet de mettre en évidence des spots présents uniquement sur l'une des deux séries de gels ;
- ✓ une analyse quantitative qui permet de comparer la densité des spots présents sur les deux séries de gels, selon trois niveaux de différence :
  - $MF \geq 2$ , le spot est sur-synthétisé dans les gels de la série 2 ;
  - $0,5 < MF < 2$ , le spot est considéré comme identique sur les deux séries de gels ;
  - $MF \leq 0,5$ , le spot est sur-synthétisé dans les gels de référence ;
- ✓ Une analyse booléenne permet de sélectionner les spots en commun, issus à la fois des analyses statistiques et des analyses qualitatives ou quantitatives.

A l'issue des analyses, une vérification visuelle des spots est toujours nécessaire.

### **III.6.6 Identification des protéines par spectrométrie de masse MALDI-TOF**

La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (Désorption-Ionisation Laser Assistée par Matrice – Temps de Vol) permet d'identifier des peptides et des protéines après hydrolyse trypsique. Elle consiste à effectuer une désorption-ionisation en bombardant par laser une matrice porteuse des échantillons, afin d'ioniser les peptides, qui passent ainsi de l'état solide à l'état

gazeux. Une fois les ions formés, ils sont accélérés à haute tension (20 KV) et envoyés jusqu'au détecteur. Les ions, ayant une énergie cinétique fixe, circulent à des vitesses différentes selon la masse de la molécule : les ions ayant une masse élevée transitent plus lentement que les ions ayant une masse plus faible. L'appareil mesure le temps que mettent les ions pour atteindre le détecteur (temps de vol) et l'associe à leur rapport masse/charge ( $m/z$ ). Le signal est visualisé en spectre et enregistré.

Tous les essais d'identification des protéines ont été effectués au sein de la plateforme protéomique PAPSSO (Plateau d'Analyse Protéomique par Séquençage et Spectrométrie de Masse, INRA, Jouy-en-Josas), selon le protocole expérimental développé par Guillot et al. (2003).

Les spots de protéines issus de l'électrophorèse bidimensionnelle sont excisés, puis lavés avec 30  $\mu$ L d'un mélange 1:1 (v:v) de carbonate d'ammonium (50 mM, Biochemica, Fluka, Steinheim, Allemagne) et d'acétonitrile 50 % (Merck, Paris) puis séchés pendant 30 min (Sécheur SpeedVac, Savant, Hicksville, NY). Ils sont ensuite réhydratés avec 50 mM de carbonate d'ammonium contenant 13 ng/ $\mu$ L de trypsine porcine, à 37 °C pendant 12 h. Le surnageant de la solution réhydratée et hydrolysée est utilisé directement pour l'analyse MALDI-TOF. Les échantillons sont déposés sur une matrice composée d'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique (4 mg/mL dans 0,1 % d'acide trifluoroacétique et 500 ml/L d'acétonitrile). Ils sont analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF en introduisant la plaque contenant les échantillons dans un appareil Voyager DE STR Instrument (Applied Biosystems, Farmingham, MA). Une calibration interne est réalisée avec deux peptides issus de la trypsine, de masses égales à 842,5 et 2211,1 Da. La Figure 15 donne un exemple de spectre obtenu par l'analyse MALDI-TOF.

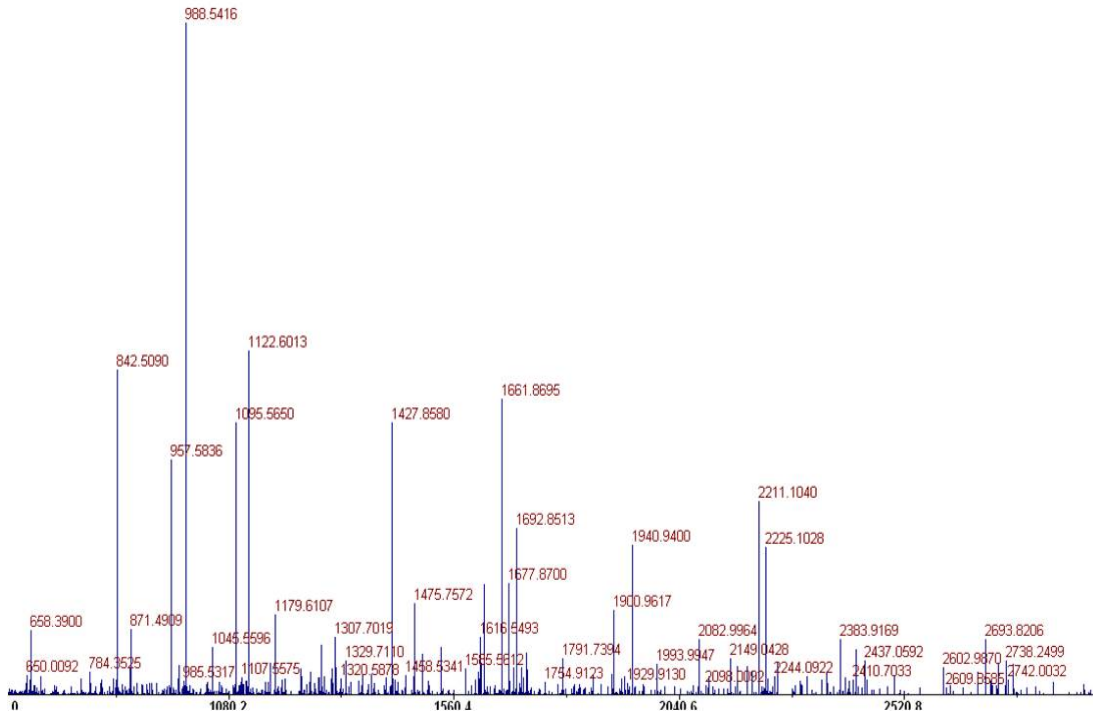


Figure 15 : Spectre de masse MALDI-TOF d'une protéine de *S. salivarius* K12 cultivé en milieu CAS

Les peptides sont identifiés à partir des listes de masses monoisotopiques obtenues expérimentalement. Ces listes sont comparées à des bases de données en utilisant le programme MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu>). Plusieurs bases publiques (*S. thermophilus* LMD9, *S. thermophilus* LMG18311 and *L. delbrueckii* CNRZ208, *S. salivarius* JIM8777 et *S. salivarius* JIM8780), et privées (*Streptococcus salivarius* K12) sont utilisées pour obtenir une identification fiable. La précision sur la masse est de 15 à 30 ppm. Il faut identifier au minimum quatre peptides et obtenir une couverture de séquence supérieure à 20 % pour confirmer un résultat d'identification. La concordance entre les masses moléculaires et les points isoélectriques des valeurs théoriques et expérimentales est également vérifiée. Lorsque tous ces critères sont atteints, la protéine est considérée comme reconnue.

### III.7 Analyse du transcriptome

L'analyse du transcriptome permet d'étudier l'ensemble des gènes transcrits dans un échantillon biologique, dans des conditions et un état physiologique donnés. Elle permet de déterminer les variations d'expression des gènes dans différentes conditions. L'analyse transcriptomique s'effectue principalement par deux techniques complémentaires : les puces à ADN et la RT-PCR. L'utilisation de puces à ADN permet de comparer quantitativement les niveaux d'expression de tous les gènes présents dans le génome de la bactérie dans diverses conditions. C'est donc une

méthode globale, qui renseigne sur l'expression d'un génome entier. La RT-PCR permet de quantifier le niveau d'expression différentielle d'un gène entre plusieurs conditions. Cette méthode nécessite une approche gène par gène, très précise, mais incompatible avec la visualisation complète d'un génome. Dans cette étude, ces deux techniques ont été utilisées, grâce à une collaboration avec l'équipe « Bactéries alimentaires et commensales » de l'unité Micalis (INRA, Jouy-en-Josas).

### **III.7.1 Extraction et vérification de la qualité des ARN**

#### ***III.7.1.1 Extraction des ARN***

L'extraction de l'ARN est l'étape commune et indispensable à toutes les techniques de transcriptomique. Le culot cellulaire est solubilisé dans des tubes Falcon de 50 mL, avec 500 µL de tampon Tris-EDTA (0,1 et 0,013 M, pH 8,0) stérile et 500 µL de phénol-chloroforme (5:1 ; pH 4,7 ; Sigma Aldrich) à 4°C. Cette solution est transférée dans un tube Eppendorf à vis de 2 mL (Polylabo, Servion, Suisse), contenant 1 g de billes de zirconium de 0,1 mm (Biospec, Bartlesville, USA) et 50 µL d'acétate de sodium 3 M pH 4,8. Les cellules sont cassées à l'aide d'un broyeur « Fast Prep FP120 BioSavant » (Qbiogene, Illkrich) pendant 30 s à une vitesse de 4,5. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 8000 g, 15 min, 4°C.

Après élimination des débris cellulaires et des protéines et récupération du surnageant, une seconde étape d'extraction est réalisée par addition de 500 µL de phénol-chloroforme, suivi d'une agitation pendant 5 min à 4°C et 90 g (Thermomixer confort, Eppendorf) puis d'une centrifugation à 4°C (8000 g, 10 min). Cette étape est répétée une seconde fois avec ajout de 500 µL de chloroforme-alcool isoamylique (24:1, Merck, Darmstadt, Allemagne) afin d'extraire une quantité maximale d'ARN avec un niveau de pureté élevé. Après centrifugation, les ARN sont précipités à l'isopropanol (1 mL) en présence d'acétate de sodium 3 M pH 4,8 (1/10<sup>ème</sup> de volume de la solution d'ARN) pendant au moins 2 h à -80 °C. Les ARN sont ensuite centrifugés (30 min, 4 °C, 8000 g) afin de culoter l'ARN. Ce dernier est lavé deux fois par addition de 1 mL d'éthanol à 70 %, puis centrifugé (10 min, 4 °C, 8000 g) pour récupérer le culot. Les ARN en culot sont ensuite séchés au SpeedVac (Savant) pendant 3 min puis re-suspendus dans 200 µL d'eau stérile. Ils sont conservés à -80 °C jusqu'à utilisation. Une mesure de la concentration en ARN est réalisée (spectrophotomètre Nanodrop, Thermoscientific, Courtaboeuf) sur les échantillons.

### ***III.7.1.2 Elimination de l'ADN résiduel et purification de l'ARN***

Afin d'éliminer l'ADN résiduel dans l'échantillon, 55 µg d'ARN sont digérés par 7,5 µL de DNase I (Roche, Boulogne-Billancourt) pendant 15 min à 37 °C, en présence de 10 µL de tampon Tris-HCl (50 mM, pH 7,5). Le volume est complété à 100 µL par de l'eau stérile.

L'ARN est purifié à l'aide du kit « RNA-cleanup and concentration Micro kit » (Norgen, Thorold, Canada). Ce kit est composé d'une colonne qui retient l'ARN et doit être utilisé à température ambiante. Des lavages et centrifugations successives permettent de purifier l'ARN. Pour cela, l'échantillon (100 µL) contenant l'ARN est additionné de 250 µL de « Binding Solution » (fournie avec le kit Norgen) et de 200 µL d'éthanol à 96%. Ce mélange est homogénéisé pendant 10 s au vortex puis déposé sur la colonne de purification, elle-même placée au dessus d'un tube pour la récupération des éluâts. Une centrifugation à 13000 g pendant 1 min, à température ambiante, permet l'adsorption de l'ARN sur la colonne. La colonne est ensuite rincée en déposant 400 µL de « wash solution » (fournie avec le kit Norgen) puis centrifugée à 13000 g pendant 1 min. Cette étape de lavage est répétée deux fois. La colonne est ensuite placée au dessus d'un tube collecteur. 25 µL d'eau stérile chauffée à 37 °C sont déposés sur la colonne. Une incubation de 5 min à température ambiante, deux centrifugations de 2 min à 180 g à température ambiante, puis une centrifugation de 1 min à 8000 g permettent de décrocher les molécules d'ARN de la colonne. L'éluât récupéré est alors redéposé sur la colonne puis re-centrifugé afin de maximiser la quantité d'ARN récupéré. L'ARN n'étant plus protégé par la colonne, l'échantillon doit être maintenu dans la glace, puis congelé et conservé à -80 °C avant analyse.

### ***III.7.1.3 Vérification de la qualité des ARN***

La qualité des ARN extraits est validée par quatre méthodes différentes et successives:

- ✓ La mesure au Nanodrop (Nanodrop ND1000 Spectrophotometer, Labtech, Palaiseau, France) permet, par mesure de l'absorbance à 260 nm, de quantifier l'ARN extrait. Elle est effectuée sur un volume de 2 µL d'ARN en solution aqueuse. La concentration d'ARN obtenue à cette étape doit être supérieure à 500 ng/µL. La Figure 16 montre, à titre d'exemple, le spectre d'un échantillon d'ARN extrait de cellules de *S. salivarius* K12 cultivé en milieu CAS ;



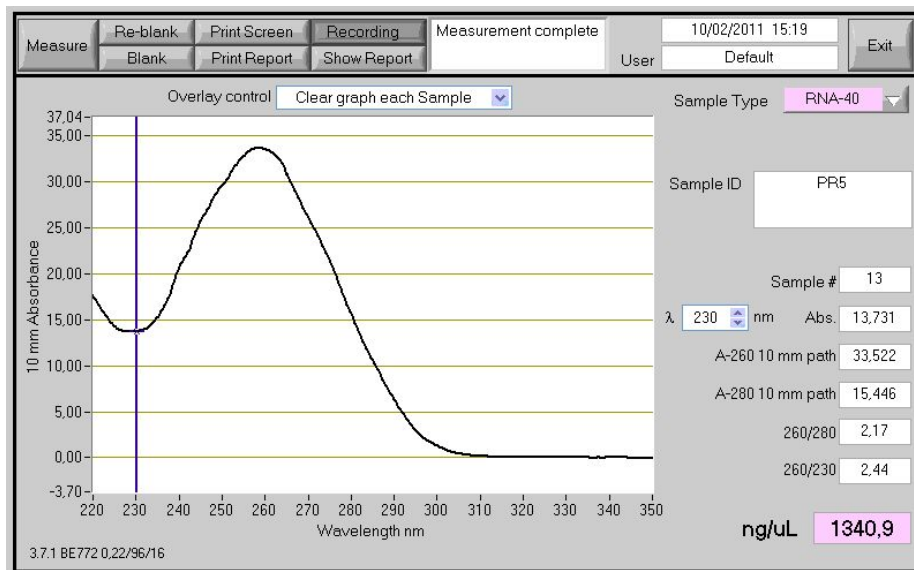


Figure 16 : Spectre d'un échantillon d'ARN de *S. salivarius* K12 cultivé en milieu CAS

- ✓ Le profil électrophorétique des ARN en gel d'agarose 2%, en conditions non dénaturantes permet de visualiser chacun des ARN 5S, 16S et 23S. Le protocole est fourni à l'annexe 6. Un ARN non dégradé possède une bande d'ARN 23 S plus intense que celle de l'ARN 16S, elle-même plus intense que la bande correspondant à l'ARN 5S. La Figure 17 montre un exemple de gel obtenu avec des ARN extraits de *S. salivarius* K12 cultivé en milieu CAS ;

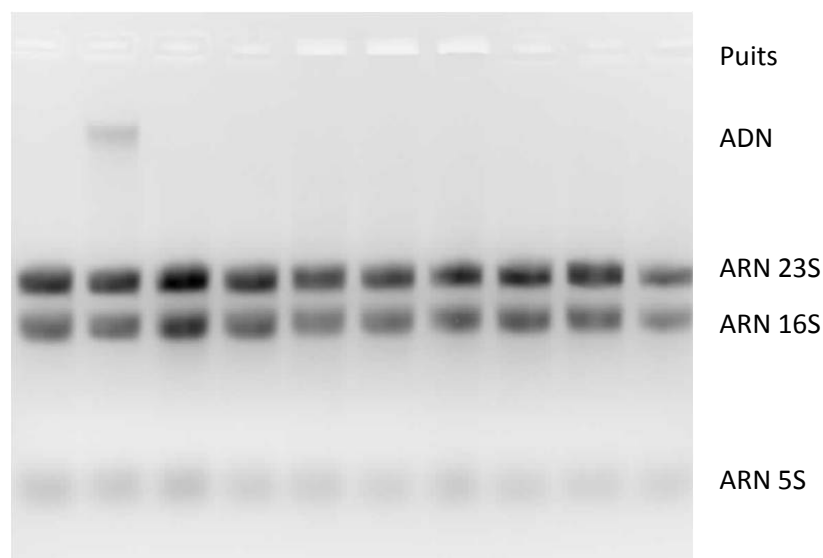


Figure 17 : Gel de migration d'ARN d'un échantillon de *S. salivarius* K12 cultivé en milieu CAS

- ✓ L'absence de contamination par l'ADN dans les échantillons d'ARN est mesurée par PCR (protocole en annexe 7), en utilisant un couple d'oligonucléotides spécifiques de l'espèce *S. salivarius* (EG1045 et EG2046)).

- ✓ La mesure du « RNA Integrity Number » (RIN) (Schroeder et al. 2006) est effectuée avec le Bioanalyser 2100 (Agilent, Waldbronn, Allemagne). Cet appareil permet de mesurer le ratio ARN 23S/ARN 16S, la concentration des ARN (ng/μL) ainsi que l'aire des pics. Le calcul du RIN est réalisé à partir de ces trois données, sachant que des ARN de bonne qualité présentent un RIN supérieur à 9. La Figure 18 illustre les résultats obtenus par cette méthode.

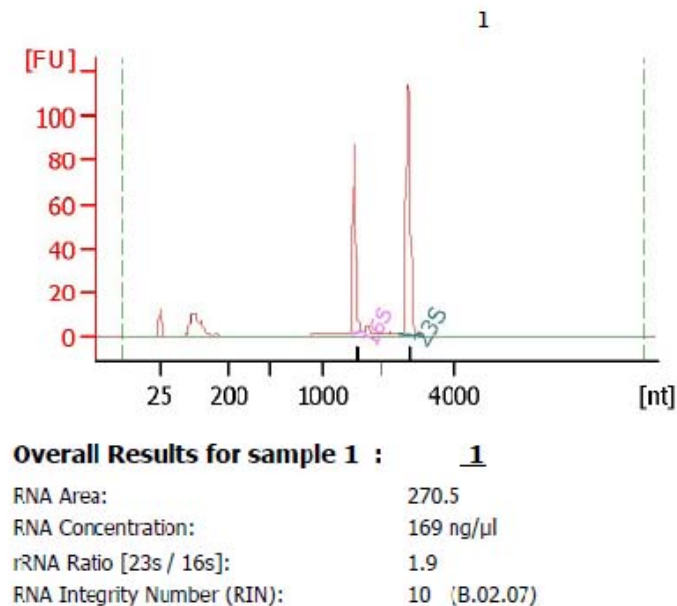


Figure 18 : Exemple d'un spectre issu du Bioanalyser 2100 (Agilent) pour un échantillon de *S. salivarius* K12 cultivé en milieu CAS. Les pics correspondent aux marqueurs ARN 5S, 16S et 23S.

### III.7.2 Puces à ADN

Le principe des puces à ADN est de greffer sur une surface des fragments synthétiques d'ADN (les sondes) représentatifs de chacun des gènes étudiés. Ces sondes sont ensuite mises en contact avec les ADNc à analyser (les cibles), préalablement couplés à un marqueur fluorescent. Ce contact entre cibles et sondes conduit à la formation d'hybrides, quantifiés grâce à la lecture des signaux fluorescents. La méthode permet d'analyser, en un même temps, un nombre considérable de séquences. De plus, le marquage simultané d'ARN obtenus dans deux conditions différentes, avec deux fluorochromes différents (rouge (Cy5) et vert (Cy3)), permet de comparer les niveaux d'expression relatifs des transcrits sur une même puce. Les deux images, obtenues dans des conditions identiques d'hybridation, sont superposées « *in silico* » pour analyser le différentiel d'expression. C'est le principe de l'hybridation compétitive, schématisée à la Figure 19. Il est aussi possible de marquer les deux séries de transcrits avec chaque fluorochrome afin de s'affranchir du biais lié à l'effet « fluorochrome ». C'est le principe de « dye swap », qui est

utilisé dans cette étude. Dans ce travail, deux répétitions biologiques indépendantes ont été réalisées.

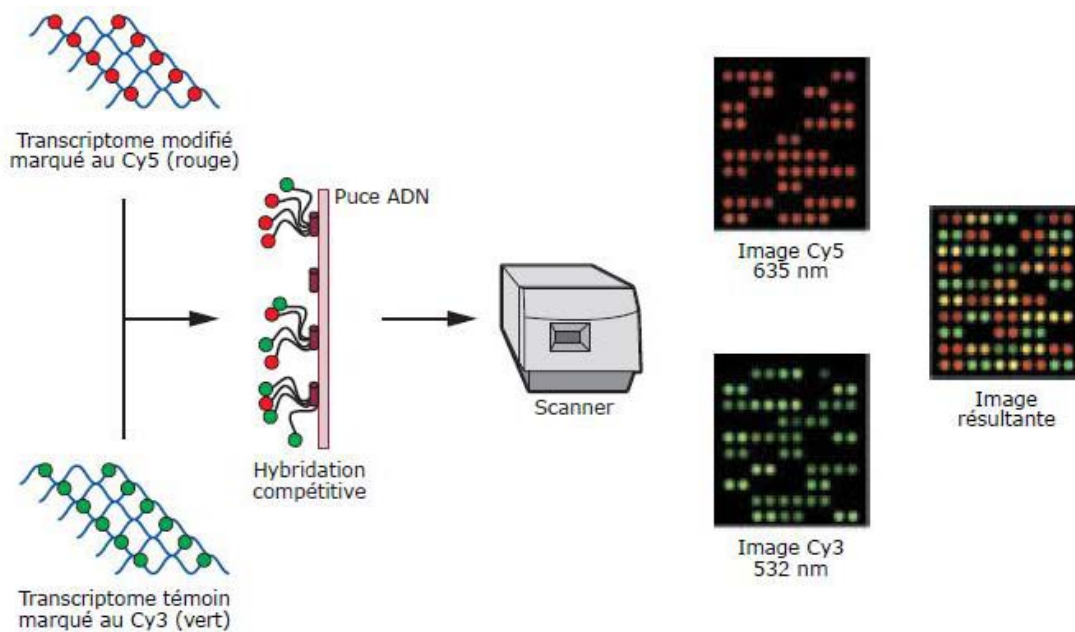


Figure 19 : Principe de l'hybridation compétitive de puces à ADN, adapté de Soularue and Gidrol (2002)

### III.7.2.1 Design des puces de type Agilent

La construction des puces nécessite une étape de création des oligonucléotides puis de design de la puce. Elles ont été réalisées par Nicolas Pons (équipe Méta-Quant, unité Micalis, INRA, Jouy en Josas) à partir du protocole de Rouillard et al. (2003).

A partir du génome de *S. salivarius* K12, de nombreuses séquences d'ADN (ou oligonucléotides) ont été générées automatiquement par le logiciel gratuit Oligo-integrator/Oligo-array ([http://berry.engin.umich.edu/oligoarray2\\_1/](http://berry.engin.umich.edu/oligoarray2_1/)), puis enregistrées dans une base de données. Les oligonucléotides sont ensuite sélectionnés selon plusieurs paramètres :

- ✓ Taille de 45 à 60 nucléotides ;
- ✓ Température de fusion ( $T_m$ ) de 75 à 95°C ;
- ✓ Pourcentage GC de 20-70% ;
- ✓ Distance minimale entre deux oligonucléotides de 30 nucléotides ;
- ✓ Absence de nombreuses répétitions (AAA, GGG, ...).

A l'issue de cette étape, une liste d'oligonucléotides correspondant à ces critères est créée, pour chaque gène. Les fonctions des gènes présents chez *S. salivarius* K12 ont été déterminées par annotation automatique du génome puis analyse comparative manuelle des séquences avec une autre souche de *S. salivarius*, la souche JIM 8777 annotée manuellement par Eric Guédon.

Les puces à ADN utilisées sont des lames de verres de type 4\*44K (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Elles sont composées de quatre emplacements comprenant chacun 44000 séquences d'ADN au maximum. La puce a été construite en prenant en compte les paramètres suivants :

- ✓ 43700 oligonucléotides positifs appartenant à la souche *S. salivarius* K12 ;
- ✓ 5\*10 répliqués d'oligonucléotides négatifs appartenant au génome de *Saccharomyces cerevisiae* ;
- ✓ Un nombre maximal de 30 oligonucléotides pour chaque gène.

Pour choisir les oligonucléotides, chaque gène est divisé en 5 parties, et un oligonucléotide appartenant à chacune de ces parties est sélectionné pour la puce. Ensuite, en fonction du nombre de places restantes sur la puce, d'autres oligonucléotides sont successivement sélectionnés dans chacune des 5 parties de chaque gène jusqu'au remplissage de la puce. La liste des oligonucléotides sélectionnés est ensuite envoyée à Agilent qui se charge de la réalisation des puces. La technologie Agilent nécessite une taille commune pour tous les oligonucléotides, c'est pourquoi, ceux inférieurs à 60 nucléotides sont complétés artificiellement par une séquence qui ne perturbe pas l'hybridation. Chaque oligonucléotide n'est présent qu'une fois sur la puce.

### ***III.7.2.2 Préparation de l'ADNc***

Les étapes de synthèse de l'ADNc sont effectuées en suivant le protocole Invitrogen associé au kit « Superscript™ indirect cDNA labeling system » (version F, mai 2007, Invitrogen, Carlsbad, Canada). Les réactifs dont la composition n'est pas indiquée sont fournis par le kit Invitrogen.

Afin d'obtenir de l'ADNc à partir de l'ARN préalablement extrait, les composés suivants sont mélangés : 10 µg d'ARN, 2 µL d'oligonucléotides "pd(N)g random nonarner" (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) et de l'eau RNase free (qsp 18 µL). Ce mélange est incubé pendant 5 min à 70 °C puis refroidi dans la glace pendant au moins 1 min afin de permettre la fixation des oligonucléotides sur les brins d'ARN.

Le mélange de rétro-transcription (6 µL de 5X Buffer, 1,5 µL d'un mix de dNTP (mélange des quatre désoxyribonucléotides), 1,5 µL de DTT 0,1 M, 1 µL de RNase OUT (40 U/mL) et 2 µL de Superscript III RT (400 U/µL), Invitrogen) est ensuite ajouté à la solution d'ARN. Après homogénéisation, le mélange est incubé pendant 3 h à 46 °C afin de permettre la synthèse d'ADNc. L'enzyme « Superscript III » permet de synthétiser des simples brins d'ADNc à partir d'ARN totaux. L'enzyme RNase Out évite une dégradation éventuelle de l'ARN par des ribonucléases contaminantes.

Après incubation, une hydrolyse alcaline et une neutralisation sont réalisées pour dégrader l'ARN présent dans l'échantillon et stopper la réaction de transcription. Pour cela, 15  $\mu\text{L}$  de NaOH 1 M sont ajoutés dans le mélange pour éliminer l'ARN. Le mélange est ensuite incubé à 70 °C pendant 10 min avant l'ajout de 20  $\mu\text{L}$  d'acétate de sodium 3 M, pH 5,2 (Invitrogen) et 15  $\mu\text{L}$  d'HCl 1 M afin de neutraliser le pH.

Une purification de l'ADN est effectuée afin d'éliminer les dNTPs non incorporés et l'ARN hydrolysé. L'échantillon est déposé sur une colonne de purification (fournie avec le kit Invitrogen), elle-même placée au dessus d'un tube de récupération des éluâts. Une centrifugation (14000 g, 1 min, température ambiante) permet l'adsorption de l'échantillon sur la colonne. La colonne est ensuite rincée avec 700  $\mu\text{L}$  de tampon de lavage (fourni avec le kit Invitrogen), puis centrifugée à 14000 g pendant 1 min afin d'éliminer l'éluât. Cette étape de lavage est répétée deux fois, puis la colonne est centrifugée afin d'éliminer tout liquide. Un tube collecteur est alors placé sous la colonne à la place du tube « déchet ». 50  $\mu\text{L}$  d'eau milliQ stérile sont déposés sur la colonne. Une centrifugation à 14000 g pendant 1 min permet de récupérer l'éluât composé d'eau et d'ADNc.

L'ADNc est alors précipité à l'éthanol. Pour cela, 10  $\mu\text{L}$  d'acétate de sodium 3 M pH 5,2, sont ajoutés à l'échantillon récupéré précédemment dans le tube collecteur. 2  $\mu\text{L}$  de glycogène (20 mg/mL) sont introduits. Après agitation, 300  $\mu\text{L}$  d'éthanol 100% à 4 °C sont ajoutés. Le mélange est incubé au moins 30 min à -20 °C afin de précipiter la majorité de l'ADN présent initialement dans le tube. L'ADN est récupéré après centrifugation (14000 g, 4°C, 10 à 20 min), élimination du surnageant, rinçage, mélange avec 250  $\mu\text{L}$  d'éthanol 75%, deuxième centrifugation (14000 g, 4°C, 10 à 20 min) et séchage sous la hotte pendant 10 min. L'ADN est ensuite re-suspendu dans 5  $\mu\text{L}$  de tampon de couplage 2X (fournis avec le kit Invitrogen), pour préparer l'échantillon à l'étape de marquage.

### ***III.7.2.3 Marquage de l'ADNc***

L'ADNc est marqué par deux fluorochromes, les cyanines 3 (Cy3<sup>TM</sup>) et 5 (Cy5<sup>TM</sup>) (Amersham Biosciences, Saclay). Les solutions de fluorochrome sont au préalable réhydratées par addition de 45  $\mu\text{L}$  de DMSO (fourni dans le kit Invitrogen), pendant 5 min à 4°C, dans le noir. 5  $\mu\text{L}$  de chaque solution de cyanines (Cy3<sup>TM</sup> et Cy5<sup>TM</sup>) sont ensuite ajoutés à l'ADNc obtenu précédemment. Pour chaque condition expérimentale, deux solutions d'ADNc avec tampon de couplage (Invitrogen) sont préparées, l'une additionnée de Cy3<sup>TM</sup> et l'autre de Cy5<sup>TM</sup>, afin de s'affranchir du biais lié à l'utilisation de chaque fluorochrome.

Une fois les ADNc marqués, il faut éliminer les fluorochromes non couplés à l'ADN, et qui pourraient interférer avec les mesures de fluorescence. Une nouvelle étape de purification est donc nécessaire, selon un protocole identique à celui suivi pour l'étape de purification de l'ADNc non marqué. A la fin des opérations successives de rinçage, la solution contenant les ADNc marqués est récupérée dans un tube collecteur et peut être utilisée directement pour l'hybridation et la création des puces.

#### ***III.7.2.4 Hybridation et scanner***

L'hybridation entre les sondes ancrées à la puce et l'ADNc couplé aux cyanines est réalisée selon le protocole et avec les réactifs fournis avec le kit Agilent « Two-color Microarray-based gene Expression analysis » ([www.agilent.com/chem/dnamanuals-protocols](http://www.agilent.com/chem/dnamanuals-protocols)). Les réactifs dont la composition n'est pas détaillée sont fournis par le kit Agilent.

Dans un tube Eppendorf, et dans la pénombre, sont mélangés 200 pmol d'ADN marqué au Cy3<sup>TM</sup> ou Cy5<sup>TM</sup>, 11 µL d'agent bloquant 10X (Agilent), 2,2 µL de tampon de fragmentation (Agilent) et de l'eau milliQ stérile (qsp 55 µL).

Ce mélange est incubé pendant 30 min à 60 °C afin de permettre la fragmentation de l'ADN. 55 µL de tampon d'hybridation 2xGE HI-RPM (Agilent) sont ensuite ajoutés au mélange précédent. La solution est homogénéisée par pipetages répétés en prenant soin de ne pas introduire de bulles. L'échantillon est ensuite placé dans la glace jusqu'à son dépôt sur lame. Les transcrits marqués au Cy3<sup>TM</sup> et au Cy5<sup>TM</sup> sont déposés avec précaution sur les lames, qui sont ensuite protégées par un couvercle et un joint afin de créer une bulle. Les lames sont ensuite introduites dans des chambres d'hybridation, elles-mêmes placées dans un four à hybridation (Agilent Technologies) pendant 16 h à 64 °C, sous rotation. Cette rotation permet le déplacement de la bulle, ce qui favorise le dépôt homogène des transcrits sur la lame.

Après l'hybridation, les lames sont lavées immédiatement avec deux solutions de lavage successives. La solution 1 est composée de 1000 mL de tampon de lavage (fourni avec le kit Agilent) et de 500 µL de Triton (Sigma Aldrich). La solution 2 est composée de 500 mL de tampon de lavage et de 250 µL de Triton. Elle est préchauffée à 37°C. Les lames sont plongées, sous agitation, dans la solution 1 pendant 1 min à 37°C où elles sont séparées de leur couvercle, puis 1 min dans la solution de lavage 2. Elles sont ensuite légèrement séchées à l'air par un mouvement régulier et sont immédiatement scannées (transport en boîtes noires pour éviter tout

contact avec la lumière) à l'aide du DNA Microarray Scanner (Agilent Technologies). Les images obtenues représentent les différents marquages sur la puce (Figure 20).

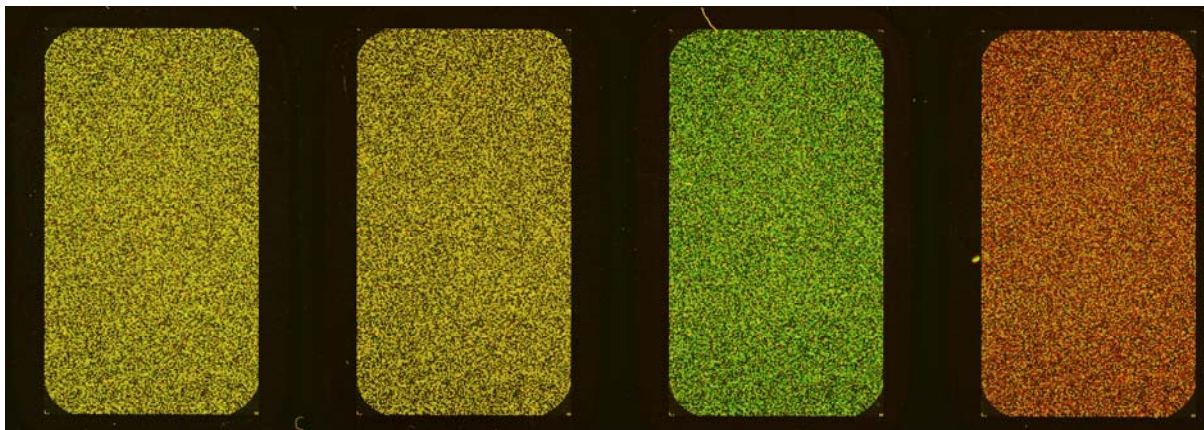


Figure 20 : Image scannée d'une lame de *S. salivarius* K12 contenant 4 puces

### **III.7.2.5 Analyse statistique**

L'analyse statistique des résultats obtenus est réalisée à l'aide du paquet « anapuce » (<http://cran.r-project.org/web/packages/anapuce/index.html>), développé par l'équipe « statistiques et génome », UMR 518 AgroParisTech/INRA (Jouy-en-Josas). Dans ce programme, les données brutes sont normalisées par la méthode de Lowess. Puis les résultats normalisés sont traités statistiquement, en considérant une variance mixte. Les *P*-values obtenues sont ensuite ajustées par la méthode de Bonferroni. Les gènes avec un ratio d'expression supérieur à 2 ou inférieur à 0,5, et une *P*-value inférieure à 5% sont considérés comme différentiellement exprimés entre les deux conditions testées.

### **III.7.3 PCR quantitative**

La PCR quantitative est utilisée dans cette étude pour valider les résultats obtenus à l'aide des puces à ADN et pour quantifier l'expression de certains gènes d'intérêt. La méthode est basée sur la détection d'une molécule fluorescente, dont la quantité est proportionnelle à la quantité de fragments amplifiés, générés lors de la PCR. Les données sont recueillies en temps réel et analysées en fin de PCR. Pour cela, l'ARN est converti en ADN complémentaire (transcription inverse), qui est ensuite amplifié et quantifié par PCR en temps réel. La quantification est possible grâce à l'incorporation du fluorochrome SYBR Green qui s'intercale dans les doubles brins d'ADN nouvellement formés.

### ***III.7.3.1 Test des oligonucléotides et des concentrations d'ADN***

Une extraction préalable des ARN est tout d'abord effectuée, selon la méthode décrite dans le paragraphe III.7.1.1.

Afin de vérifier la bonne hybridation entre les oligonucléotides synthétisés et les gènes correspondants, les oligonucléotides sont testés, en début d'expérience, contre de l'ADN chromosomique de la souche *S. salivarius* K12.

#### ***III.7.3.1.1 Création des oligonucléotides***

Les oligonucléotides sont créés à l'aide du logiciel Mobyly développé par l'Institut Pasteur (<http://mobyly.pasteur.fr>). La séquence du gène est introduite dans le logiciel avec les paramètres de création souhaités. Dans ce travail, les paramètres suivants sont exigés :

- ✓ Oligonucléotide de taille égale à 22 nucléotides ;
- ✓ Fragment amplifié d'environ  $125 \pm 5$  pb ;
- ✓ Température de fusion comprise entre 57 et 62 °C ;
- ✓ % GC compris entre 40 et 55 % ;
- ✓ Un maximum de 3 nucléotides répétés (AAA, GGG, ..).

Le logiciel propose plusieurs couples d'amorces correspondant à ces critères. Le meilleur couple est sélectionné visuellement, en évitant les possibilités de repliement de l'oligonucléotide sur lui-même (séquence répétée inversée) et la formation de « dimers de primers » (appariement entre les deux amorces). Un haut pourcentage GC est également recherché, comme gage d'une bonne spécificité de l'amorce. Les couples d'oligonucléotides sont ensuite synthétisés par la société Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Allemagne). La spécificité de l'amorce choisie est également vérifiée en blastant la séquence de l'amorce sur le génome de *S. salivarius* K12 pour vérifier sa concordance avec le gène souhaité et uniquement celui-ci. La liste des oligonucléotides utilisés et leurs caractéristiques sont présentées en annexe 8.

#### ***III.7.3.1.2 Test de l'efficacité des oligonucléotides et des concentrations d'ADN***

L'ADN chromosomique de *S. salivarius* K12 (conservé à -20°C) est décongelé puis maintenu dans la glace. La concentration en ADN dans l'échantillon est estimée à l'aide du spectrophotomètre Nanodrop (Labtech, Palaiseau), puis des dilutions successives au  $10^{\text{ème}}$  (de  $1/50^{\text{ème}}$  à  $1/500000^{\text{ème}}$ ) de cet ADN sont effectuées pour construire la courbe étalon. Les amorces fournies sous forme lyophilisées (Eurofins MWG Operon), sont réhydratées avec de l'eau milliQ stérile pour obtenir des solutions à 100  $\mu\text{M}$  qui sont conservées à -20°C, puis diluées à 20  $\mu\text{M}$  lors de leur utilisation.



Sur chaque puits de la plaque de PCR (3 puits par condition), sont déposés successivement 10 µL d'ADN chromosomique à différentes concentrations (ou d'eau pour les témoins négatifs), 12,5 µL de mix PCR (Absolute Blue SYBR Green Rox, Thermoscientific ABgene, Courtaboeuf, contenant le fluorochrome SYBR Green, les nucléotides et la polymérase), 0,15 µL de chacun des 2 oligonucléotides (20 µM) correspondants au gène à tester et 2,2 µL d'eau milliQ stérile. La plaque est recouverte d'un film plastique qui est scellé à l'aide d'un thermoscelleur (As<sup>2</sup>™, 4titude, Wotton, UK) pour éviter l'évaporation pendant les cycles de température. La plaque est ensuite déposée dans l'appareil de Q-PCR (Mastercycler ep gradient, Eppendorf, Le Pecq). Chaque puits de la plaque est référencé à l'aide du logiciel Mastercycler ep realplex (Eppendorf), puis le programme d'hybridation est enregistré et exécuté (annexe 9).

A la fin des 40 cycles d'amplification, des courbes représentant la fluorescence en fonction du nombre de cycles et pour les différentes dilutions d'ADN chromosomique sont obtenues pour chaque couple d'oligonucléotides testé (Figure 21).

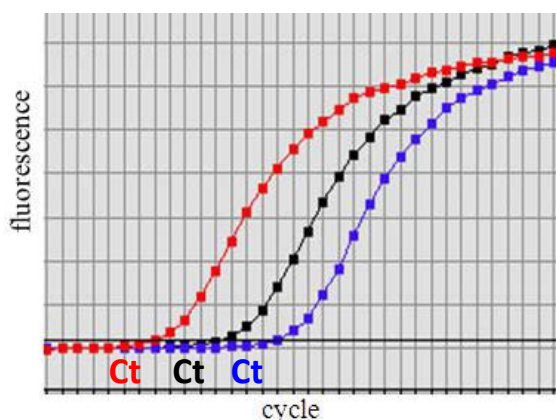


Figure 21 : Courbe obtenue après amplification de 3 concentrations d'ADN chromosomique de *S. salivarius* K12 avec un même couple d'oligonucléotides

A partir de ces courbes, le logiciel calcule automatiquement le « threshold cycle » (Ct) qui correspond au nombre de cycles PCR nécessaires pour générer une quantité détectable de fluorescence. La courbe étalon, représentant les Ct en fonction de la quantité initiale d'ADN chromosomique est alors établie. La pente de la droite obtenue permet de calculer l'efficacité de l'oligonucléotide utilisé selon la formule suivante :

$$\text{Efficacité} = 10^{-1/(\text{pente})} - 1$$

Un oligonucléotide est considéré comme valable si son efficacité est comprise entre 90% et 100%. A l'issue de cette étape, seuls les oligonucléotides dont l'efficacité est satisfaisante sont sélectionnés.

### ***III.7.3.2 Q-PCR des ADN complémentaires***

Les Q-PCR sont ensuite réalisées pour chaque couple d'amorce et avec chaque ADN complémentaire. Un gène de référence est sélectionné, sur le critère d'une expression stable dans les différentes conditions à tester. Il s'agit du gène *rrf* (séquence en annexe 8). Puisque les Ct varient selon les essais et les différentes plaques, ces derniers sont normalisés pour chaque couple d'oligonucléotides par rapport à la valeur du Ct obtenu sur la même plaque avec les amorces du gène *rrf*.

Ainsi, pour obtenir le différentiel d'expression d'un gène (*x*) entre deux conditions (1 et 2), les Ct(*x*): Ct(*x*<sub>1</sub>) et Ct(*x*<sub>2</sub>) et les Ct(*rrf*): Ct(*rrf*<sub>1</sub>) et Ct(*rrf*<sub>2</sub>), obtenus sur la même plaque, sont déterminés. Le Ct normé du gène *x* entre les deux conditions testées est ensuite calculé à partir de la formule suivante :

$$\text{Ct}(x)\text{norm} = [\text{Ct}(x_1) - \text{Ct}(x_2)] - [\text{Ct}(rrf_1) - \text{Ct}(rrf_2)]$$

A partir du Ct normé, on peut calculer le différentiel d'expression du gène *x* (nombre de fois où le gène *x* est plus exprimé dans une condition par rapport à l'autre), par la formule suivante :

$$\text{Différentiel d'expression } (x) = 2^{(\text{Ct}(x)\text{norm})}$$

Les résultats PCR ont été utilisés dans ce travail pour valider les données acquises par la méthode des puces à ADN, en comparant les différentiels d'expression obtenus par ces deux méthodes, pour un gène donné.



## **IV. Résultats et discussion**

### **IV.1 Création d'une salive artificielle et étude du comportement de *Streptococcus salivarius* K12 dans ce milieu**

#### **IV.1.1 Contexte et objectifs de l'étude**

La synthèse bibliographique a permis de rapporter plusieurs études sur les propriétés probiotiques et l'innocuité de *S. salivarius*, notamment de la souche K12. En revanche, le comportement de cette espèce bactérienne n'a jamais été décrit dans des conditions environnementales se rapprochant des conditions buccales.

Dans ce contexte, la première partie de ce travail vise à créer une salive artificielle dont la composition serait proche de celle de la salive humaine, et qui pourrait être utilisée comme milieu pour étudier le comportement de *S. salivarius*. Afin de caractériser l'adaptation de *S. salivarius* K12 dans ce nouveau milieu, une comparaison des cinétiques de croissance et de maintenance est réalisée dans trois milieux de culture différents : le milieu salive artificielle complété par des éléments nutritifs simulant un « repas », le bouillon M17 comme milieu de référence pour les streptocoques et un milieu mixte composé de la salive artificielle et des composants nutritifs du bouillon M17. Le comportement de *S. salivarius* dans ces milieux est évalué par différents outils : quantification de la croissance par dénombrements, mesure de différents paramètres de l'état physiologique par marquages fluorescents des cellules et analyse par cytométrie en flux, analyse du protéome intracellulaire et mesure de l'activité bactériocine.

Les résultats obtenus font l'objet d'une publication parue dans « Journal of Applied Microbiology » (Roger et al. 2011a), qui constitue la partie IV.1.2 et d'un paragraphe complémentaire (IV.1.3) sur l'activité bactériocine.

## **IV.1.2 Caractérisation de la croissance et de la maintenance de *Streptococcus salivarius* dans une salive artificielle**

### ***IV.1.2.1 Résumé***

Objectif : Afin de mieux comprendre comment les facteurs environnementaux influencent l'implantation de la bactérie orale commensale *Streptococcus salivarius* K12 au sein de la cavité buccale, nous avons caractérisé son comportement dans une salive artificielle.

Méthodes et Résultats : *S. salivarius* K12 est cultivé dans une salive artificielle complémentée par un apport nutritif, dans les conditions de pH et de température rencontrées dans la bouche. La phase exponentielle de croissance est caractérisée par un taux de croissance élevé ( $2,8 \text{ h}^{-1}$ ). Durant la phase de maintenance, un découplage se produit entre la croissance et la production d'acide lactique, ce qui permet un maintien de la viabilité (95%), du pH intracellulaire (pH 6,6) et de la polarisation membranaire (95%), et donc par conséquent, de la force proton motrice. Cependant, en phase stationnaire avancée, la viabilité (64%) et la vitalité sont dégradées. Cette dégradation est expliquée par une diminution de la synthèse de protéines impliquées dans le métabolisme énergétique et celui du glycogène, en milieu salive, par rapport à un milieu plus riche.

Conclusions : *S. salivarius* est capable de croître rapidement dans un milieu salive artificielle. Cependant, une dégradation de son état physiologique est observée en phase stationnaire avancée.

Intérêt de l'étude : Ce travail montre que la salive artificielle est un milieu qui permet à *S. salivarius* de croître dans des conditions simulant celles rencontrées dans la bouche (environnement physico-chimique, addition de repas), mais pas de maintenir une viabilité et une vitalité élevées en conditions de carence nutritionnelle.

Mots Clés : Salive artificielle, cytométrie en flux, cinétique de croissance, état physiologique, protéome, *Streptococcus salivarius*

### ***IV.1.2.2 Publication***

## ORIGINAL ARTICLE

**Characterization of *Streptococcus salivarius* growth and maintenance in artificial saliva**

P. Roger, J. Delettre, M. Bouix and C. Béal

AgroParisTech, INRA, UMR782, Thiverval-Grignon, France

**Keywords**artificial saliva, flow cytometry, growth kinetics, physiological state, proteome, *Streptococcus salivarius*.**Correspondence**Catherine Béal, INRA, AgroParisTech, UMR782, F-78850 Thiverval-Grignon, France.  
E-mail: beal@grignon.inra.fr

2011/0482: received 22 March 2011, revised 6 June 2011 and accepted 6 June 2011

doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05077.x

**Abstract****Aims:** To help gain a better understanding of factors influencing the establishment within the oral cavity of *Streptococcus salivarius* K12, a commensal oral bacterium, we characterized its behaviour in artificial saliva.**Methods and Results:** *Streptococcus salivarius* K12 was grown in artificial saliva complemented with a representative meal, under oral pH and temperature conditions. Exponential growth phase was characterized by a high specific growth rate ( $2.8 \text{ h}^{-1}$ ). During maintenance phase, an uncoupling between growth and lactic acid production occurred, which allowed maintaining viability (95%), intracellular pH (6.6) and membrane polarisation (95%), and thus proton motive force. However, in late stationary phase, viability (64%) and vitality were degraded as a result of lower synthesis of energetic and glycogen-related proteins as compared to a richer medium.**Conclusions:** *Streptococcus salivarius* was able to rapidly grow in complemented artificial saliva. Nevertheless, a degradation of its physiological state was observed in late-stationary phase.**Significance and Impact of the Study:** This work demonstrates, for the first time, that artificial saliva was a convenient medium that permitted *Strep. salivarius* to grow in oral conditions (physico-chemical environment, addition of meals) but not to maintain cellular viability and vitality in starvation conditions.**Introduction**

*Streptococcus salivarius* is a lactic acid bacterium that is mainly encountered in the mouths of human beings. It is the first commensal bacterium that appears in the oral cavity of newborns where it colonizes the upper respiratory tract (Aas *et al.* 2005). According to the study by Gibbons and van Houte (1971) and Guglielmetti *et al.* (2010), it efficiently adheres to the oral epithelial cells and represents more than 50% of the streptococci present on the tongue (Gibbons *et al.* 1964). The presence of adhesion systems such as pili, fibrils, saliva-binding proteins and host-cell-binding proteins, together with its high competition rate, helps this species to stay in the mouth throughout the human lifetime (Nobbs *et al.* 2009).

Many studies have been carried out with the strain *Strep. salivarius* K12, which displays a probiotic potential

in the oral cavity (Tagg 2004). It produces two bacteriocins, salivaricin A and salivaricin B, that help to inhibit and control some pathogenic bacteria. These proteins are particularly active against *Streptococcus pyogenes* (Tagg 2004), which is frequently isolated from the upper respiratory tract. This pathogenic bacterium is responsible for streptococcal pharyngitis, tonsillitis and related infections of the inner ear (Cunningham 2000). With the help of bacteriocin production and competition against bacteria that generate halitosis by producing volatile sulphur compounds (VSCs), *Strep. salivarius* K12 also contributes to decreasing oral malodour (Tagg *et al.* 2009), although this property is not systematically observed with other *Strep. salivarius* strains (Sterer and Rosenberg 2006). In addition, *in vitro* studies using mammalian cell lines indicate that *Strep. salivarius* may reduce inflammatory responses (Cosseau *et al.* 2008;

Guglielmetti *et al.* 2010). Owing to its strategic location and probiotic properties, *Strep. salivarius* seems to be well adapted to mouth conditions where it participates in maintaining good health. By taking these considerations into account, *Strep. salivarius* K12 is still used in combination with a chlorhexidine mouth rinse to reduce halitosis (Tagg *et al.* 2009). Nevertheless, in some studies, the artificial establishment of *Strep. salivarius* K12 is limited, thus reducing its beneficial action (Horz *et al.* 2007; Power *et al.* 2008). As no convincing explanation for this failure of *Strep. salivarius* establishment is available, we first hypothesize that the oral environment is probably involved.

The oral cavity is a complex and heterogeneous microbial habitat. Food particles and cell debris provide some nutrients, thus contributing to the establishment of favourable conditions for microbial growth. This environment is consolidated by a constant humidity and an atmosphere that is mainly composed of expired air (Wenzel *et al.* 1994). Oral temperatures are comprised between 33.2 and 38.1°C, depending on the subject (Sund-Levander *et al.* 2002), and saliva pH between 5.3 and 7.8, depending on the subject, saliva flow and food intake (Del Vigna de Almeida *et al.* 2008). In contrast, saliva contains enzymes such as lysozyme, lactoperoxidase and amylase, which may have an antibacterial action (Del Vigna de Almeida *et al.* 2008). These conditions may affect *Strep. salivarius* growth.

*In vitro* studies of *Strep. salivarius* growth have been conducted both in real human saliva (Schenkels *et al.* 1993) and in rich media (Levesque *et al.* 2004; Cosseau *et al.* 2008), but few studies were performed in an artificial saliva. Numerous 'artificial saliva' media have been published (Gal *et al.* 2001). Their compositions slightly differ from natural human saliva; for example, organic components are added for microbial growth studies (Bradshaw *et al.* 2002; Sissons *et al.* 2007), whereas others studies use a rich medium supplemented with about 2 g l<sup>-1</sup> mucin to mimic oral conditions (Saunders *et al.* 2000; Sissons *et al.* 2007; Chavez de Paz *et al.* 2008).

Based on this information, knowledge is currently insufficient about the behaviour of *Strep. salivarius* in an artificial saliva medium combined with mouth-like environmental conditions. In this context, defining an artificial saliva medium as close as possible to natural saliva will allow us to better understand the impact of this medium on the kinetics and implantation of *Strep. salivarius* in the mouth. This study aims at characterising the growth and physiological state of the strain *Strep. salivarius* K12 in an artificial saliva medium in comparison with M17, a commercial medium that is commonly used for streptococci (Terzaghi and Sandine 1975), and a mixed medium that combines components from M17

and artificial saliva. Environmental conditions of pH and temperature were chosen to mimic the mouth environment.

## Materials and methods

### Bacterial strain and media

*Streptococcus salivarius* K12 (BLIS Technologies Ltd, Dunedin, New Zealand) was used in this study. Frozen cells were stored at -80°C in M17 broth (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) supplemented with 15% glycerol. Cells were precultured twice, for 24 and 15 h, in M17 broth at 37°C.

Three different culture media were used in this study: a reference medium (M17 broth; Biokar Diagnostics), an artificial saliva to which a 'representative meal' was added (complemented artificial saliva, CAS) and a mixed medium composed of M17 broth to which the components of artificial saliva were added (MM). Artificial saliva medium contained the following compounds: 0.90 g l<sup>-1</sup> KCl, 0.66 g l<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.08 g l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 0.49 g l<sup>-1</sup> KHCO<sub>3</sub>, 0.37 g l<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub>, 0.12 g l<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub>, 0.60 g l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl, 0.20 g l<sup>-1</sup> urea and 2.00 g l<sup>-1</sup> porcine stomach type III mucin (Sigma-Aldrich, Lyon, France). Ionic and urea concentrations were similar to those found in human saliva (Edgar 1990). Mucin concentration corresponded to whole salivary proteins content. The representative meal was composed of glucose 5 g l<sup>-1</sup> (Merck, Darmstadt, Germany) and meat extract solution 1.4 g l<sup>-1</sup> (Biokar Diagnostics).

All media were sterilized in the fermentor at 115°C for 20 min. The pH was adjusted to 6.7 with 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and inoculation was carried out at 1 × 10<sup>6</sup> CFU ml<sup>-1</sup>.

### Measurements of lactic acid sensitivity

The cellular sensitivity to lactic acid of *Strep. salivarius* K12 was determined by using a Bioscreen C system (Labsystem, Helsinki, Finland). Increased concentrations from 0 to 4 g l<sup>-1</sup> lactic acid (VWR, Fontenay-sous-Bois, France) were added to the three media (CAS, M17 and MM), and the initial pH was adjusted to 6.7 by adding 2 mol l<sup>-1</sup> KOH. Each medium was inoculated at 1 × 10<sup>6</sup> CFU ml<sup>-1</sup>, distributed on a 100-well microtitre plate and incubated at 37°C for at least 16 h. The absorbency was automatically measured at 600 nm at 15-min intervals, and the plates were shaken before each measurement. Each condition was repeated 10 times. Results are given as the ratio between the specific growth rate determined for each condition ( $\mu$ , in h<sup>-1</sup>) and the maximal growth rate obtained in the absence of lactic acid for each medium ( $\mu_{\text{max}}$ , in h<sup>-1</sup>).

### Fermentation conditions

Cultures were grown in a 2.2-l fermentor (LSL Biolafitte, St-Germain-en-Laye, France) with a 1.5-l working volume. Environmental conditions were 37°C (mouth temperature) and pH 6.7 (mean value of human saliva pH). An agitation speed of 150 min<sup>-1</sup> was applied to permit homogenisation. The pH was controlled by the automatic addition of a 2 mol l<sup>-1</sup> KOH solution to counteract acidification. The KOH consumption in the bioreactor was measured using WCIDUS software (INRA, Thiverval-Grignon, France).

Fermentations were carried out in duplicate, and the reproducibility was assessed according to the following descriptors: the maximal rate of KOH consumption (g l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), final KOH consumption (g l<sup>-1</sup>) and cell counts (CFU ml<sup>-1</sup>). Samples were taken from the fermentor every hour, from inoculation to 10 h and in late stationary phase (25 h after inoculation).

### Carbohydrates and lactic acid measurements

Lactose, glucose and lactic acid concentrations were quantified using high-performance liquid chromatography (HPLC; Waters Associates, Millipore, Molsheim, France). Before HPLC analyses, each sample was precipitated with 120 g l<sup>-1</sup> trichloroacetic acid (Prolabo, Paris, France), centrifuged at 4000 g for 30 min at 4°C and filtered (0.22 µm). The HPLC analysis was performed on a cation-exchange column (Aminex Ion Exclusion HPX-87H 300 × 7.8 mm; Bio-Rad, Richmond, CA, USA) at 35°C, with propionic acid (10 g l<sup>-1</sup>) as an internal standard. The mobile phase was composed of 0.005 mol l<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and the flow rate was set at 0.6 ml min<sup>-1</sup> (LC-6A pump; Shimadzu, Courtaboeuf, France). Compounds were detected by a refractometric detector (Waters 410; Waters Associates, Milford, MA, USA), and results were analysed using MILLENIUM software (Waters Associates) (Wang *et al.* 2011). The following descriptors were assessed: maximal consumption or production rate, lag time and maximal lactic acid production or sugar consumption at the end of cultures. All measurements were duplicated.

### Measurement of cultivability, viability and mortality

Cultivability was evaluated by plate counts. Cells were plated onto M17 agar (Biokar diagnostics) and incubated at 37°C for 24 h under anaerobic conditions (Genbox 96124; bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Each result was the geometrical mean of at least three counts. The following three parameters made it possible to describe growth: maximal growth rate (h<sup>-1</sup>), lag time (h) and maximal cultivability (CFU ml<sup>-1</sup>).

Dual staining of each sample with both carboxyfluorescein diacetate (cFDA) and propidium iodide (PI) allowed to differentiate viable, dead and damaged cells (Rault *et al.* 2007). The cFDA was used to assess the level of esterase activity of *Strep. salivarius* K12, and the nucleic acid dye PI made it possible to quantify cells with damaged membranes. Cell suspensions were diluted in Mac Ilvaine (MI) buffer, pH 7.3 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2 mol l<sup>-1</sup>; citric acid, 0.1 mol l<sup>-1</sup>) to reach 1.10<sup>6</sup> cells ml<sup>-1</sup>. One millilitre of the diluted suspension was supplemented with 5 µl PI (1.496 mmol l<sup>-1</sup> in distilled water; Sigma-Aldrich) and 5 µl of cFDA Chemchrome V8 commercial solution (AES Chemunex Inc., Cranbury, NJ, USA) diluted in acetone. It was incubated for 15 min at 40°C before analysis by flow cytometry. PI and cFDA fluorescence intensity made it possible to divide the cell population into three physiological states, which were expressed as percentages of viable, dead and damaged cells.

### Intracellular pH measurement

The fluorochrome 5-(6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (cFDA-SE) was used for pH<sub>i</sub> measurements. A calibration curve was established beforehand by plotting the logarithm of the mean fluorescence intensity as a function of the pH of equilibrated cells, in the range of pH 5.5–7.0 (Rault *et al.* 2008). After staining with cFDA-SE (Invitrogen, Eragny-sur-Oise, France) for 10 min at 40°C, 100 µl of cell suspension was diluted in 1 ml of MI buffer, pH 6.7, to obtain 1.10<sup>6</sup> cells ml<sup>-1</sup>. The fluorescence intensity was measured by flow cytometry, and the linear calibration curve made it possible to quantify the intracellular pH.

### Vitality evaluation

Vitality was evaluated by measuring the ability of the cells to release intracellular carboxyfluorescein (cF) upon energisation by sugar addition (Bunthof *et al.* 2000). Two tubes with 1 ml of cell suspension were centrifuged, and the pellets were resuspended in 1 ml pH 7.3 MI buffer. Each tube was supplemented with 10 µl of cFDA Chemchrome V8 commercial solution and incubated for 10 min at 40°C. They were centrifuged, and each pellet was resuspended in 1 ml of MI buffer, pH 7.3, with 100 mmol l<sup>-1</sup> of glucose. One tube was directly analysed by flow cytometry to determine the initial fluorescence intensity (IF<sub>0</sub>). The other tube was reincubated for 10 min at 40°C to allow cF release before a second flow cytometric analysis (IF<sub>10</sub>). The fluorescence difference between these two measurements was associated with the cF efflux and then with cellular vitality. The loss of fluorescence intensity after 10 min (ΔIF, in %) was



considered as a measurement of cellular vitality and was calculated using the following formula:

$$\Delta IF = \left( \frac{(IF0 - IF10)}{IF0} \right)$$

### Depolarisation assessment

Bis (1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol (DIBAC<sub>4</sub>(3); Invitrogen) was used to assess the depolarisation state of the cells (Ben Amor *et al.* 2002). One millilitre of a bacterial suspension was diluted in MI buffer, pH 7.3, to obtain  $1 \times 10^6$  cells ml<sup>-1</sup>, and incubated with 5  $\mu$ l DIBAC<sub>4</sub>(3) (96.78  $\mu$ mol l<sup>-1</sup> in dimethylsulfoxide; Invitrogen-Molecular Probes, Cergy-Pontoise, France) for 10 min at 40°C before flow cytometry analysis. The fluorescence intensity of samples was related to the intensity obtained with dead cells, completely depolarized by heating at 80°C for 20 min and to which 0.2 mmol l<sup>-1</sup> of antibiotics (valinomycin and nigericin; Sigma-Aldrich) was added. Results were expressed as depolarisation ratios (%) that were calculated by dividing the polarisation level of the samples with that of completely depolarized cells.

### Flow cytometry and data analyses

Flow cytometry analyses were performed with a CyFlow<sup>®</sup> space cytometer (Partec GmbH, Münster, Germany) equipped with a specific volumetric counting system, an air-cooled argon ion laser emitting at 488 nm, and four band-pass filters: a forward-angle light scatter (FSC) combined with a diode collector, a side-angle light scatter (SSC) and two fluorescence signals collected with photomultiplier tubes. A 530-nm band-pass filter (515–545 nm) was used to collect the green fluorescence of carboxyfluorescein and DIBAC<sub>4</sub>(3) probes and a 630-nm long-pass filter to collect the red fluorescence of PI. Logarithmic gains and specific detector settings were adjusted on a sample with unstained cells to eliminate cellular autofluorescence. A combination of FSC and SSC was used to discriminate the bacteria from the background (Rault *et al.* 2007).

Data were collected and analysed with FLOWMAX software (Partec). Subpopulations were identified using dot plots of FSC, SSC, green fluorescence and red fluorescence, which separated the different events. With the aid of statistical tables given by FLOWMAX software, we were able to ascertain the numbers (in cells ml<sup>-1</sup>) and percentages of stained cells determined by each detector, along with the mean fluorescence intensity of each fluorescent signal and the corresponding coefficients of variation. Each result corresponded to the mean of at least four measurements.

### Statistical analysis

Sugar and KOH consumption curves, lactic acid production and growth curves were fitted using a nonlinear model, according to the study by Zwietering *et al.* (1990). These models made it possible to determine the latency phase, the rate of variation and the asymptotic value of each curve. All statistical analyses were carried out with STATGRAPHICS/Plus/ver. 3.0 software (Statistical Graphics Corp., Rockville, MD, USA).

### Proteome analysis

The cytosolic proteome of cells harvested after 25-h fermentation in MM and CAS media was investigated by two-dimensional electrophoresis (Bio-Rad System, Marnes-la-Coquette, France), as previously described (Wang *et al.* 2005). The samples were analysed in triplicate. Each spot was matched among the different gels, and the spot intensities were compared (PDQuest; Bio-Rad). Conditions were compared by calculating a modifying factor (MF) as the ratio of the normalized intensity of protein spots in cells grown in CAS medium to that of the same spot in cells grown in MM. Proteins showing an MF higher than 2 (enhanced synthesis) or lower than 0.5 (reduced synthesis) were considered as significantly different. These protein spots were excised from the gel and hydrolysed with trypsin before being analysed by mass spectrometry (MALDI-TOF) as previously described (Wang *et al.* 2005) on the PAPPSSO proteomic platform (<http://pappso.inra.fr/>). For protein identification, the monoisotopic mass lists characterising each protein were searched against *Streptococcus thermophilus* LMD9, *Strep. thermophilus* LMG18311 and *Lactobacillus delbrueckii* CNRZ208 (KEGG database), *Strep. salivarius* JIM8777 and JIM8780 (NCBI database, in progress), and *Strep. salivarius* K12 (private database) (BLIS Technologies Ltd and Nestlé Research Center, Lausanne, Switzerland).

### Results

To characterize the behaviour of *Strep. salivarius* in CAS medium, controlled pH batch cultures were prepared. They were compared with batch cultures in M17 medium (M17) and MM.

### Growth and cellular physiological state

The growth of *Strep. salivarius* K12 was quantified by cultivability and viability measurements. Cultivability represents the ability of the cells to grow on a specific agar medium. Viable cells are defined as cells showing esterase

activity together with membrane integrity from dual fluorescent staining. Dead cells are identified as they lack esterase activity and show poor membrane integrity (Rault *et al.* 2007). As shown in Fig. 1a, the lag time differed slightly according to the medium because a 30-min delay was observed between M17 medium and CAS or mixed media. The shorter lag time was obtained in M17 and was attributed to the slightly higher inoculum rate ( $1.9 \times 10^6$  CFU ml<sup>-1</sup> instead of  $1.0 \times 10^6$  CFU ml<sup>-1</sup>). By considering standard deviations, specific growth rates were similar in the three media ( $2.79 \pm 1.05$  h<sup>-1</sup>). In contrast, the duration of the exponential phase strongly differed according to the medium. It was shorter in CAS medium (3 h) as compared to M17 and mixed media ( $4.5 \pm 0.5$  h). Consequently, the beginning of the growth curves was similar in the three media, but growth ceased earlier in CAS medium, thus leading to a lower maximal CFU. During the stationary phase, CFU was equal to  $3.8 \times 10^9 \pm 6 \times 10^8$  CFU ml<sup>-1</sup> in M17 and MM, whereas in CAS medium, it was 10-fold lower ( $2.1 \times 10^8 \pm 2 \times 10^7$  CFU ml<sup>-1</sup>). These final CFU remained constant until 25 h of culture in the three media.

These cultivability assays were completed by determining viability and mortality rates during the stationary phase, from simultaneous PI and cFDA staining combined with multiparametric flow cytometry detection. The percentage of viable cells in M17 and MM reached a maximum value of  $98 \pm 1\%$  and remained stable during the stationary phase (Fig. 1b), whereas <1% of dead and injured cells were counted. In CAS medium, the percentage of viable cells was similar after 5 h of fermentation ( $95 \pm 4\%$ ), thus confirming that growth was similar until the stationary phase. However, while CFU was maintained in the stationary phase until 25 h, percentages of dead and damaged cells increased at the expense of viable cells, whose proportion decreased to  $64 \pm 9\%$ .

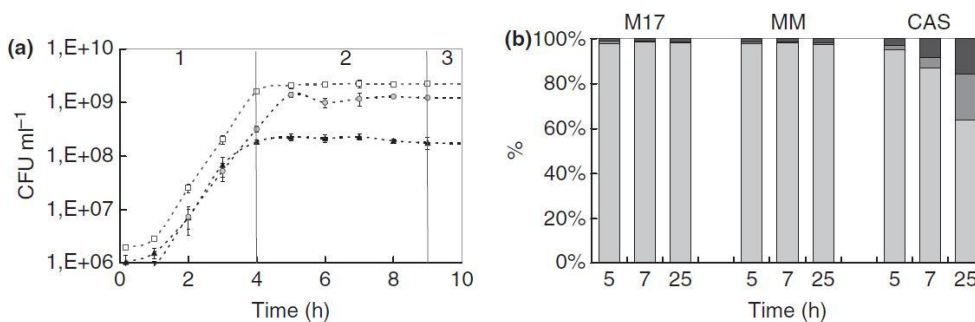
By considering these growth and viability parameters, it was concluded that *Strep. salivarius* K12 easily adapted

itself to the three media because of the short lag times and the high growth rates. Nevertheless, cells reached higher concentrations and displayed a better and more stable physiological state in M17 and MM than in CAS medium.

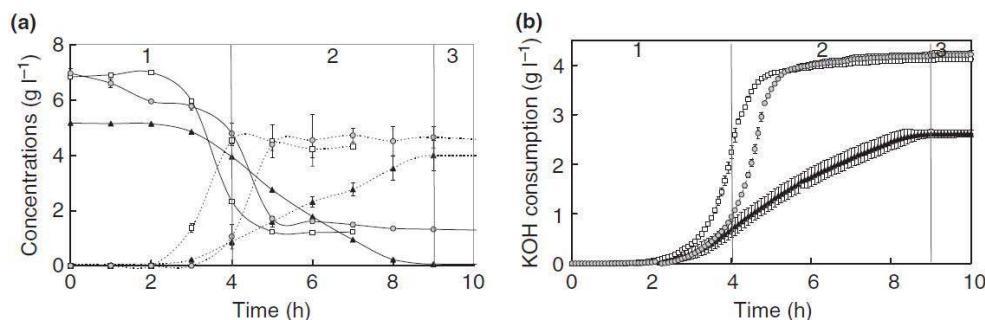
#### Substrate consumption and lactic acid production

Figure 2a shows that lactic acid production occurred in the three culture media as a result of sugar consumption during fermentation. The acidification was compensated for by adding KOH to maintain the pH at a constant value of 6.7 (Fig. 2b) to simulate in-mouth conditions. As shown in Fig. 2b, strong differences existed between CAS, MM and M17 media. They concerned both KOH consumption rate, which was 4.4 times lower in CAS medium than in MM and M17 media, and lag phase, which was 30 min longer in CAS and mixed media. These results were confirmed by considering the time course of sugar and lactic acid concentrations (Fig. 2a). The sugar consumption rate and the lactic acid production rate were four times higher in MM or M17 than in CAS medium. The final KOH concentration was 1.5 times lower in CAS medium than in mixed or M17 media. This observation can be explained by the final lactic acid concentration, which was lower in CAS medium as compared to MM and M17 media, owing to the lower initial sugar concentration ( $5.2 \pm 0.3$  g l<sup>-1</sup> instead of  $6.9 \pm 0.4$  g l<sup>-1</sup>).

The final sugar concentration was stable after 5 h of culture and equal to  $1.5 \pm 0.3$  g l<sup>-1</sup> in MM and M17 media, thus indicating that sugar was not a limiting compound in these media. In CAS medium, sugar was consumed and lactic acid was produced after 5-h culture, even if growth had stopped. Sugar was depleted after 9 h of fermentation, thus indicating that sugar was not limiting for growth, whereas it became restrictive during the stationary phase. Lactic acid concentration became stable at  $3.8 \pm 0.5$  g l<sup>-1</sup> in CAS medium after 9 h of culture.



**Figure 1** Time course of physiological characteristics of *Streptococcus salivarius* K12 throughout fermentations performed in M17 (□), mixed medium (●) and complemented artificial saliva media (▲). (a) Cultivability (CFU ml<sup>-1</sup>), divided into 3 phases (1, 2 and 3). (b) Relative percentages of viable (■, in %), damaged (■, in %) and dead (■, in %) cells measured at 5, 7 and 25 h of culture, depending on the media.



**Figure 2** Time course of sugar, lactic acid and KOH concentrations during fermentations of *Streptococcus salivarius* K12 performed in M17 (□), mixed medium (●) and complemented artificial saliva media (▲), divided into 3 phases (1, 2 and 3). (a) Sugar consumption (—, in g l<sup>-1</sup>) and lactic acid production (- - -, in g l<sup>-1</sup>). (b) KOH consumption (g l<sup>-1</sup>).

These observations were in agreement with KOH kinetics (Fig. 2b), which showed that KOH consumption stopped later than growth in CAS medium. Yields were calculated based on these results. In MM and M17 media, final lactic acid conversion yield was similar ( $1.30 \pm 0.02 \text{ mol}_{\text{lactic acid}} \text{ mol}_{\text{sugar}}^{-1}$ ), whereas it was higher in CAS medium ( $1.50 \text{ mol mol}^{-1}$ ). On the other hand, final growth yield was 10-fold higher in MM and M17 media ( $3.2 \times 10^8 \pm 8 \times 10^7 \text{ CFU ml}^{-1} \text{ g}_{\text{sugar}}^{-1}$ ) than in CAS medium ( $4.3 \times 10^7 \text{ CFU ml}^{-1} \text{ g}_{\text{sugar}}^{-1}$ ). When these observations were combined, they indicated that a strong uncoupling occurred in CAS medium between growth and lactic acid production. Conversely, in M17 and MM, growth and lactic acid production were coupled until growth ceased. The lactic acid concentration corresponding to growth arrest differed in the three media. It was equal to  $4.5 \pm 0.2 \text{ g l}^{-1}$  in MM and M17 media, but to  $0.9 \pm 0.2 \text{ g l}^{-1}$  in CAS medium. It can be hypothesized that the early arrest of growth in CAS medium was ascribed to a higher sensitivity to lactic acid or to a lack of nutrients other than sugar.

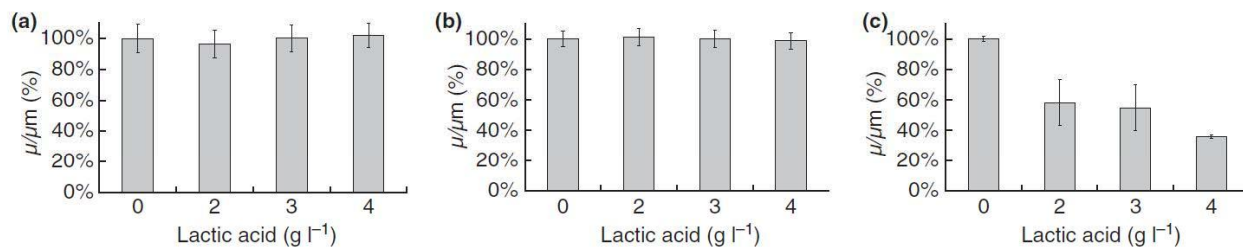
To address this hypothesis, susceptibility of *Strep. salivarius* K12 to lactic acid was determined in M17, MM and CAS media. Figure 3 shows the relative maximum specific growth rates ( $\mu/\mu_m$ ) as a function of increased lactic acid concentrations, which were normalized according to those measured without lactic acid. In MM and

M17 media, the relative specific growth rates remained constant and above 96%, regardless of the lactic acid concentration. The growth rate was not affected by lactic acid. However, in CAS medium, a 60% drop in the relative growth rate was observed between 0 and  $4 \text{ g l}^{-1}$  of lactic acid. This suggests that lactic acid inhibition was a major factor that accounted for the end of growth and the uncoupling observed in CAS medium. Finally, these results showed that growth was favoured in M17 and MM media, which did not display any significant uncoupling. Conversely, in CAS medium, a strong uncoupling was necessary to help the cells withstand lactic acid inhibition.

#### Energetic metabolism

To better understand the physiological state that characterizes the cells of *Strep. salivarius* K12 grown in M17, MM and CAS media, vitality, depolarisation and intracellular pH (pHi) were assessed, using adapted fluorochromes and multiparametric flow cytometry. Vitality is defined here as the ability of the cells to actively excrete a fluorescent dye (Bunthof *et al.* 2000). Results are presented in Table 1.

The depolarisation level remained constant throughout the cultures. Consequently, the values presented in Table 1 are the average of four measurements that were



**Figure 3** Effect of lactic acid concentration on relative maximum specific growth rate of *Streptococcus salivarius* K12 in M17 (a), mixed medium (b) and complemented artificial saliva (c) media. The  $\mu/\mu_m$  values represent the ratio of specific growth rates measured in the samples and without added lactic acid.

**Table 1** Parameters of energetic metabolism characterising *Streptococcus salivarius* K12 cultivated in M17, MM and CAS media

Media	M17	MM	CAS
Depolarisation rate (%)	5.8 ± 0.98	1.6 ± 0.13	4.9 ± 3.59
Intracellular pH	6.88 ± 0.13	6.70 ± 0.10	6.56 ± 0.12
Vitality (%)	90.0 ± 1.4	84.0 ± 7.1	20.0 ± 1.4

MM, mixed medium; CAS, complemented artificial saliva.

Each parameter represented an average of four measurements ± standard deviation, during the stationary phase (between 4 and 25 h of cultivation).

made between 5 and 25 h after inoculation. Based on standard deviations, no significant difference was observed between fermentation media. The rate of depolarisation remained stable and lower than 6%. Consequently, the cells remained polarized all along the cultures, in the three media.

Regardless of the considered medium, the pHi remained stable during growth and the stationary phase. Consequently, the values presented in Table 1 are the average of four measurements that were made between 4 and 25 h after inoculation. In M17 medium, pHi was slightly higher than external pH (pHe = 6.70), thus leading to a pH gradient of 0.18. In CAS and mixed media, pHi was not significantly different than pHe, thus indicating that the cells had to maintain their membrane potential ( $\Delta\Psi$ ) to generate their proton motive force (pmf). The slightly low value obtained in CAS medium was considered as being not significantly different from pHe, as previously considered by Kashket (1987) with *Lactobacillus acidophilus*. According to Table 1, the percentage of cells that excrete cFDA was higher than 84% in M17 and MM, whereas it was four times lower in CAS medium. As the vitality measurement is represented by the ability of the cells to actively export the cF in the presence of ATP, this result indicates that transport systems were less active in CAS medium than in the other media.

Finally, our results showed that cellular state observed in MM was close to those obtained in M17, except for pHi values. This may indicate that one specific component of artificial saliva acted on pHi. Conversely, many differences in energetic parameters were observed between cells grown in M17 or MM media and cells recovered from CAS medium. These differences were in agreement with those previously observed from growth kinetics.

#### Proteome analysis of stationary phase cells

To better explain the differences in growth and energetic parameters previously observed according to growth media, the protein pattern of cells grown in CAS medium was compared to those obtained in MM. Cells were

recovered in the late stationary phase (after 25 h of fermentation) to compare their proteome independently of their growth phase. Twenty-six proteins were at least two-fold more or less abundant, in comparison with cells grown in CAS and MM media. After identification by MALDI-TOF analysis, the protein names, biochemical characteristics and functions were determined.

By comparing protein synthesis in cells cultivated in CAS and MM media, 20 proteins were more abundant in MM, whereas six proteins were more synthesized in CAS medium (Table 2). Among these 26 proteins, 16 proteins were classified as energetic metabolism proteins, six corresponded to transcription and translation proteins, three belonged to amino acid or nucleotide metabolisms, and the last one was a stress protein. The synthesis of 15 energetic metabolism proteins was increased in cells grown in MM as compared to CAS medium. Three proteins were related to glycogen anabolism and catabolism pathways (GlgA, GlgC and GlgP). Four proteins that were synthesized exclusively in MM belonged to lactose metabolism (LacD, LacX, LacB and LacF), which was coherently explained by the presence of lactose in MM. The abundance of three proteins involved in translation mechanisms (RpsF, RplL and rpsB) increased in CAS medium, while the stress protein ClpP was more present in MM. From this information, we propose that cells grown in CAS medium displayed a less active carbohydrate metabolism as compared to cells grown in MM.

#### Discussion

To understand how *Strep. salivarius* K12 cells adapt to CAS, results obtained from growth and acidification kinetics, from measurements of physiological state characteristics and from lactic acid sensitivity were combined. They made it possible to divide the growth curve obtained into three phases by comparison with M17 and mixed media. The first phase corresponded to exponential growth, the second one to the maintenance phase and the third one to the advanced stationary phase (Figs 1 and 2).

During the first phase, a similar start of growth and lactic acid production occurred in the three media until 4 h of culture. The lag time, specific growth rate and lactic acid production rate were similar, thus involving the same amount of ATP generation, regardless of the media considered. The specific growth rate value ( $2.79 \text{ h}^{-1}$ ) corresponded to a very short generation time of 15 min. It was higher than the one obtained with *Strep. thermophilus*, a species closely related to *Strep. salivarius*, as described in the study by Béal *et al.* (1989) ( $1.74 \text{ h}^{-1}$ ) and Adamberg *et al.* (2003) ( $2.2 \text{ h}^{-1}$ ) under optimal culture conditions. In the light of these data, we assumed that *Strep. salivarius* adapted itself well to CAS medium and

**Table 2** Characteristics of proteins showing different intensity levels in the stationary phase, in cells grown in CAS medium and in MM medium

pI	Mw	Name	Function	IL CAS*	IL MM*	MF†
Energetic metabolism						
4.7	36.5	LacD	Tagatose 1,6 di-phosphate aldolase	0	3080	0.00
5.0	34.6	LacX	Protein lac X	0	685	0.00
5.1	18.9	LacB	Galactose 6-P isomerase	0	11298	0.00
5.1	11.5	LacF	Lactose-specific phosphate transferase	0	1420	0.00
4.8	53.8	GlgA	Glycogen synthase	0	431	0.00
4.7	41.7	GlgC	Glucose 1-phosphate adenylyl transferase	169	2306	0.07
5.1	91.7	GlgP	Glycogen phosphorylase	297	1087	0.27
5.0	54.4	Pyk	Pyruvate kinase	0	554	0.00
5.2	25.8	GpmA	Phospho-glyceromutase	0	520	0.00
4.6	35.1	DhaK	PTS-dependent dihydroxyacetone kinase	121	834	0.15
5.4	35.2	PrsA	Ribose phosphate pyrophosphokinase A1	115	482	0.24
4.8	33.5	GlcK	Glucokinase	161	448	0.36
4.8	62.8	Pgm2	Phosphoglucomutase 2	362	769	0.47
5.0	65.3	GlmS	Glucosamine-fructose-6-P aminotransferase	246	618	0.40
4.7	47.9	GlmM	Phosphoglucosamine mutase	0	694	0.00
5.4	36.0	Gap	Glyceraldehyde 3-P dehydrogenase	5055	892	5.67
Transcription-translation						
5.4	47.3	TyrS	Tyrosine tRNA ligase	121	375	0.32
4.9	51.0	AsnS	Asparagine tRNA synthase	267	709	0.38
5.1	21.1	–	Ribosomal protein S30AE family protein	346	752	0.46
4.9	11.1	RpsF	30S Ribosomal protein rpsF S6	3923	1692	2.32
4.5	12.3	RplL	50S Ribosomal protein rplL L7/L12	1855	522	3.55
5.0	28.4	RpsB	30S Ribosomal protein rpsB S2	1476	0	∞
Amino acid and nucleotide metabolism						
5.1	22.7	PyrE	Orotate <i>P</i> -ribosyl transferase	123	385	0.32
5.0	33.8	DapA	Dihydrodipicolinate synthase	807	221	3.65
5.0	46.2	CysD	Homocystein synthase	425	0	∞
Stress						
5.1	44.7	ClpP	ATP-dependent Clp protease	0	898	0.00

Pi, Isoelectric point; Mw, Molecular weight (kDa); MM, mixed medium; CAS, complemented artificial saliva.

\*Protein spot intensity level in MM (IL MM) and CAS (IL CAS) media.

†Modifying factor: MF = IL CAS/IL MM.

did not suffer from any lack of nutrients to start growth. In addition to glucose and meat extract that were added as a representative meal, the presence of mucin, a glyco-protein that can act as a carbohydrate source (Marsh and Bradshaw 1997), might play a role in this adaptation. This rapid growth of *Strep. salivarius* under in-mouth conditions is very useful because a rapid turnover of saliva and nutrients occurs in the human oral cavity (Dawes 2008).

In the second phase, between 4 and 9 h of culture, uncoupling between growth and lactic acid production occurred in CAS medium. When entering the stationary phase, cells continued to consume sugars to produce lactic acid and ATP. Growth arrest was associated with elevated viability, a null pH gradient and a high and stable membrane polarisation level. Vitality was nevertheless affected as it was equal to 20% instead of 90% in the

other media. This uncoupling phenomenon could be linked either to the higher susceptibility of *Strep. salivarius* to lactic acid in CAS medium than in MM or M17 media, or to the lack of some essential nutrients. Otherwise, *Strep. salivarius* might enter a nongrowing phase, despite the presence of residual nutrients, to protect itself from future deprivation, as explained by Chavez de Paz *et al.* (2008) with other oral bacteria. To elucidate this behaviour, growth in other media was compared to growth in CAS medium. In mixed and M17 media, the stationary phase corresponded to both the end of growth and the end of KOH consumption. Moreover, viability and vitality were close to 100% and we observed no membrane depolarisation. It may thus be concluded that cells had sufficient energy to maintain their proton motive force (pmf). In M17 medium, a pH gradient of 0.2 was obtained, in agreement with the results obtained

by Siegumfeldt *et al.* (2000), who measured a pH gradient of 0.3–0.6 in the stationary phase after growth of *Strep. thermophilus* in M17. In mixed and in CAS media, pHi was equal to pHe. This pHi allowed *Strep. salivarius* to maintain many enzymatic activities such as glycolysis, which can continue until pH 4.3 (Quivey *et al.* 2000). The difference observed between M17 and other media could be related to the presence of artificial saliva compounds such as salts, mucin and urea, which may modify ion exchanges across the cellular membrane. As no membrane depolarisation was observed in CAS medium, the pmf was maintained. However, the lower vitality observed in CAS medium indicated that the active transport systems involved in active cFDA excretion and the proton translocating ATPase (Quivey *et al.* 2000) were affected in CAS medium. These observations indicated that the metabolic activity of the cells in CAS medium, because of sugar consumption, was mainly devoted to maintaining cells in a viable state and with good membrane integrity during the stationary phase, at the expense of their active transport systems.

The third phase corresponded to the advanced stationary phase, between 9 and 25 h of culture. In CAS medium, viability of *Strep. salivarius* K12 dramatically decreased, to the benefit of an increase in damaged and dead cells when all of the sugar was consumed. This behaviour has been observed even when cultivability was not affected, as was already shown with the oral bacterium *Streptococcus anginosus* (Chavez de Paz *et al.* 2008). A drop in viability indeed occurred after 24 h of starvation, whereas cultivability was maintained. Conversely, in M17 and mixed media, viability did not decrease even after 25 h of culture, thus indicating that the physiological state was better maintained in these media.

To explain the degradation of the physiological state of *Strep. salivarius* K12 in the stationary phase in CAS medium, the cytoplasmic proteome of cells cultivated in CAS and mixed media was analysed. Among the 20 proteins that were more abundant in MM, and after elimination of the four proteins involved in lactose metabolism, 11 proteins were classified as carbohydrate metabolism proteins. They contributed to maintaining higher metabolic activity in MM as compared to CAS medium. The proteins GlgA and GlgC are involved in glycogen storage, and GlgP is used to catabolize glycogen into glucose-1-phosphate (Wilson *et al.* 2010). Glycogen is a major intracellular reserve polymer stored during limiting growth conditions and used to cope with starvation conditions and to provide energy for maintenance under nongrowing conditions (Wilson *et al.* 2010). The presence of glycogen metabolism proteins in MM alone may explain the good vitality and viability rates in this

medium, even in the third growth phase. Conversely, in CAS medium, problems encountered by *Strep. salivarius* to maintain viability and vitality could be explained by a lack of these glycogen-related proteins.

Another interesting result concerns the increased abundance of three proteins involved in translation when cells were cultivated in CAS medium instead of MM. The ribosomal protein RpsF S6 has been identified as a heat-and cold-shock-inducible protein in *Myxococcus xanthus* (Otani *et al.* 2001). The 50S ribosomal protein RplL is known to control misreading during translation (Kirsebom and Isaksson 1985). The ribosomal protein RpsB S2 was recognized as being involved in bile salt stress (Sanchez *et al.* 2005), whereas its synthesis decreased under other stress conditions (Arena *et al.* 2006). In MM, these proteins were less present, but the ClpP protein involved in stress adaptation was more synthesized. This protein is involved in general stress response and, particularly, in folding or misfolding of proteins affected by stress conditions. Thus, in CAS and in MM, synthesis of these specific proteins might correspond to cellular responses to different stress conditions generated during the stationary phase. In the future, it would be interesting to validate this result by considering pooled human salivary filtrate instead of artificial saliva. Finally, based on these results, it can be concluded that CAS medium, which partly mimics human saliva that is the natural ecological niche of *Strep. salivarius*, allowed its growth but was not an optimum medium for its maintenance. This is in agreement with the findings of De Jong *et al.* (1986), who observed that growth of oral bacteria was two times lower in human whole saliva agar as compared to reference blood agar.

As a final conclusion, this work made it possible to characterize the growth and maintenance of *Strep. salivarius* K12 in CAS in comparison with conventional culture media during controlled pH and temperature cultures. It made it possible to identify three growth phases. During the first phase when nutrients were introduced into the artificial saliva, growth started quickly at a high growth rate, thus allowing the cells to establish themselves in the saliva. This is particularly interesting within a context of real human conditions that are characterized by a strong turnover. During phases 2 and 3, degradation of viability and vitality in artificial saliva could be explained by a lack of glycogen and energy-related proteins in phase 3. Before extrapolating these results to real oral conditions, the effect of salivary enzymes has to be checked. Moreover, continuous culture studies will be carried out to effectively mimic the dynamics of the oral cavity. Finally, as artificial saliva was a preliminary approximation of real human saliva as a growth medium, a comparative proteomic approach will be carried out in a next stage.

## Acknowledgements

The authors thank Dr Jeremy Burton (BLIS Technologies Ltd, New Zealand) for providing the strain *Strep. salivarius* K12, Dr Bernard Berger (Nestlé Research Center, Lausanne, Switzerland) for giving us access to *Strep. salivarius* K12 database and Dr Françoise Rul (INRA Jouy-en-Josas, France) for scientific revision.

## References

- Aas, J.A., Paster, B.J., Stokes, L.N., Olsen, I. and Dewhirst, F.E. (2005) Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* **43**, 5721–5732.
- Adamberg, K., Kask, S., Laht, T.M. and Paalme, T. (2003) The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: a pH-auxostat study. *Int J Food Microbiol* **85**, 171–183.
- Arena, S., D'Ambrosio, C., Renzone, G., Rullo, R., Ledda, L., Vitale, F., Maglione, G., Varcamonti, M. et al. (2006) A study of *Streptococcus thermophilus* proteome by integrated analytical procedures and differential expression investigations. *Proteomics* **6**, 181–192.
- Béal, C., Louvet, P. and Corrieu, G. (1989) Influence of controlled pH and temperature on the growth and acidification of pure cultures of *Streptococcus thermophilus* 404 and *Lactobacillus bulgaricus* 398. *Appl Microbiol Biotechnol* **32**, 148–154.
- Ben Amor, K., Breeuwer, P., Verbaarschot, P., Rombouts, F.M., Akkermans, A.D.L., De Vos, W.M. and Abee, T. (2002) Multiparametric flow cytometry and cell sorting for the assessment of viable, injured, and dead *Bifidobacterium* cells during bile salt stress. *Appl Environ Microbiol* **68**, 5209–5216.
- Bradshaw, D.J., Marsh, P.D., Hodgson, R.J. and Visser, J.M. (2002) Effects of glucose and fluoride on competition and metabolism within in vitro dental bacterial communities and biofilms. *Caries Res* **36**, 81–86.
- Bunthof, C.J., van den Braak, S., Breeuwer, P., Rombouts, F.M. and Abee, T. (2000) Fluorescence assessment of *Lactococcus lactis* viability. *Int J Food Microbiol* **55**, 291–294.
- Chavez de Paz, L.E., Hamilton, I.R. and Svensater, G. (2008) Oral bacteria in biofilms exhibit slow reactivation from nutrient deprivation. *Microbiology* **154**, 1927–1938.
- Cosseau, C., Devine, D.A., Dullaghan, E., Gardy, J.L., Chikata-marla, A., Gellatly, S., Yu, L.L., Pistolic, J. et al. (2008) The commensal *Streptococcus salivarius* K12 downregulates the innate immune responses of human epithelial cells and promotes host–microbe homeostasis. *Infect Immun* **76**, 4163–4175.
- Cunningham, M.W. (2000) Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin Microbiol Rev* **13**, 470–511.
- Dawes, C. (2008) Salivary flow patterns and the health of hard and soft oral tissues. *J Am Dent Assoc* **139**(Suppl), 18S–24S.
- De Jong, M.H., Van Der Hoeven, J.S. and Van Os, J.H. (1986) Growth of micro-organisms from supragingival dental plaque on saliva agar. *J Dent Res* **65**, 85–88.
- Del Vigna de Almeida, P., Greggio, A.M., Machado, M.A., de Lima, A.A. and Azevedo, L.R. (2008) Saliva composition and functions: a comprehensive review. *J Contemp Dent Pract* **9**, 72–80.
- Edgar, W.M. (1990) Saliva and dental health. Clinical implications of saliva: report of a consensus meeting. *Br Dent J* **169**, 96–98.
- Gal, J., Fovet, Y. and Adib-Yadzi, M. (2001) About a synthetic saliva for in vitro studies. *Talanta* **53**, 1103–1115.
- Gibbons, R.J. and van Houte, J. (1971) Selective bacterial adherence to oral epithelial surfaces and its role as an ecological determinant. *Infect Immun* **3**, 567–573.
- Gibbons, R.J., Kapsimalis, B. and Socransky, S.S. (1964) The source of salivary bacteria. *Arch Oral Biol* **9**, 101–103.
- Guglielmetti, S., Taverniti, V., Minuzzo, M., Arioli, S., Stuknyte, M., Karp, M. and Mora, D. (2010) Oral bacteria as potential probiotic for the pharyngeal mucosa. *Appl Environ Microbiol* **76**, 3948–3958.
- Horz, H.P., Meinelt, A., Houben, B. and Conrads, G. (2007) Distribution and persistence of probiotic *Streptococcus salivarius* K12 in the human oral cavity as determined by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol* **22**, 126–130.
- Kashket, E.R. (1987) Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiol Lett* **46**, 233–244.
- Kirsebom, L.A. and Isaksson, L.A. (1985) Involvement of ribosomal-protein L7/L12 in control of translational accuracy. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**, 717–721.
- Levesque, C., Vadeboncoeur, C. and Frenette, M. (2004) The csp operon of *Streptococcus salivarius* encodes two predicted cell-surface proteins, one of which, CspB, is associated with the fimbriae. *Microbiology* **150**, 189–198.
- Marsh, P.D. and Bradshaw, D.J. (1997) Physiological approaches to the control of oral biofilms. *Adv Dent Res* **11**, 176–185.
- Nobbs, A.H., Lamont, R.J. and Jenkinson, H.F. (2009) *Streptococcus* adherence and colonization. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**, 407–450.
- Otani, M., Tabata, J., Ueki, T., Sano, K. and Inouye, S. (2001) Heat-shock-induced proteins from *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **183**, 6282–6287.
- Power, D., Burton, J., Chilcott, C., Dawes, P. and Tagg, J. (2008) Preliminary investigations of the colonisation of upper respiratory tract tissues of infants using a paediatric formulation of the oral probiotic *Streptococcus salivarius* K12. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **27**, 1261–1263.
- Quivey, R.G., Kuhnert, W.L. and Hahn, K. (2000) Adaptation of oral streptococci to low pH. *Adv Microb Physiol* **42**, 239–274.
- Rault, A., Béal, C., Ghorbal, S., Ogier, J.C. and Bouix, M. (2007) Multiparametric flow cytometry allows rapid

- assessment and comparison of lactic acid bacteria viability after freezing and during frozen storage. *Cryobiology* **55**, 35–43.
- Rault, A., Bouix, M. and Béal, C. (2008) Dynamic analysis of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1 physiological characteristics during fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* **81**, 559–570.
- Sanchez, B., Champomier-Verges, M.C., Anglade, P., Baraige, F., de los Reyes-Gavilan, C.G., Margolles, A. and Zagorec, M. (2005) Proteomic analysis of global changes in protein expression during bile salt exposure of *Bifidobacterium longum* NCIMB 8809. *J Bacteriol* **187**, 5799–5808.
- Saunders, K.A., Greenman, J. and McKenzie, C. (2000) Ecological effects of triclosan and triclosan monophosphate on defined mixed cultures of oral species grown in continuous culture. *J Antimicrob Chemother* **45**, 447–452.
- Schenkels, L.C.P.M., Ligtenberg, A.J.M., Veerman, E.C.I. and Van Nieuw Amerongen, A. (1993) Interaction of the salivary glycoprotein EP-GP with the bacterium *Streptococcus salivarius* HB. *J Dent Res* **72**, 1559–1565.
- Siegmundfeldt, H., Rechinger, K.B. and Jakobsen, M. (2000) Dynamic changes of intracellular pH in individual lactic acid bacterium cells in response to a rapid drop in extracellular pH. *Appl Environ Microbiol* **66**, 2330–2335.
- Sissons, C.H., Anderson, S.A., Wong, L., Coleman, M.J. and White, D.C. (2007) Microbiota of plaque microcosm biofilms: effect of three times daily sucrose pulses in different simulated oral environments. *Caries Res* **41**, 413–422.
- Sterer, N. and Rosenberg, M. (2006) *Streptococcus salivarius* promotes mucin putrefaction and malodor production by *Porphyromonas gingivalis*. *J Dent Res* **85**, 910–914.
- Sund-Levander, M., Forsberg, C. and Wahren, L.K. (2002) Normal oral, rectal, tympanic and axillary body temperature in adult men and women: a systematic literature review. *Scand J Caring Sci* **16**, 122–128.
- Tagg, J.R. (2004) Prevention of streptococcal pharyngitis by anti-*Streptococcus pyogenes* bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Streptococcus salivarius*. *Indian J Med Res* **119**, 13–16.
- Tagg, J.R., Chilcott, C.N. and Burton, J.P. (2009) Treatment of malodour. United States Patent US 7595041 B2.
- Terzaghi, B.E. and Sandine, W.E. (1975) Improved medium for lactic *Streptococci* and their bacteriophages. *Appl Environ Microbiol* **29**, 807–813.
- Wang, Y., Delettre, J., Guillot, A., Corrieu, G. and Béal, C. (2005) Influence of cooling temperature and duration on cold adaptation of *Lactobacillus acidophilus* RD758. *Cryobiology* **50**, 294–307.
- Wang, Y., Delettre, J., Corrieu, G. and Béal, C. (2011) Starvation induces physiological changes that act on the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus* RD758. *Biotechnol Prog* **27**, 342–350.
- Wenzel, V., Idris, A.H., Banner, M.J., Fuerst, R.S. and Tucker, K.J. (1994) The composition of gas given by mouth-to-mouth ventilation during CPR. *Chest* **106**, 1806–1810.
- Wilson, W.A., Roach, P.J., Montero, M., Baroja-Fernández, E., Muñoz, F.J., Eydallin, G., Viale, A.M. and Pozueta-Romero, J. (2010) Regulation of glycogen metabolism in yeast and bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **34**, 952–985.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M. and Van't Riet, K. (1990) Modeling of the bacterial growth curve. *Appl Environ Microbiol* **56**, 1875–1881.





pétri contenant la salive artificielle complémentée, et aucun halo d'inhibition n'est détecté. Ces résultats indiquent que la production de bactériocines, actives contre *Lb. sakei*, se produit après une croissance sur milieux M17 et MM, mais pas en milieu CAS.

#### ***IV.1.3.3 Discussion et conclusion***

L'absence de production de bactériocine peut être liée soit à une inhibition de l'activité par des composants de la salive, soit à une inhibition liée aux conditions nutritives différentes dans le milieu CAS. Les composés salivaires (sels, mucine, urée) étant présents dans le milieu mixte, la présence d'un halo en milieu mixte indique que ces éléments n'empêchent pas l'action bactériocine. En conséquence, un ou plusieurs éléments nutritifs présents dans le milieu M17 (Annexe 1) sont probablement nécessaires pour obtenir une activité bactériocine. Il peut s'agir du lactose (5 g/L) présent dans le M17 au lieu du glucose en milieu CAS, ou d'autres composants tels que la tryptone, l'hydrolysate peptique de viande, la peptone papaïnique de soja, l'extrait de levure, le glycérophosphate de sodium, le sulfate de magnésium ou l'acide ascorbique.

Cette interprétation est cohérente avec la littérature. En effet, une revue traitant de la production de bactériocines par les bactéries lactiques (Parente and Ricciardi 1999) indique que de nombreux paramètres de culture influent sur cette fonctionnalité, notamment le milieu de culture (sources de carbone et d'azote, composition ionique), le pH et la température. Une étude montre que la production de salivaricine CRL par *Lactobacillus salivarius* est favorisée par un ajout de NaCl (5 g/L) et de glycérol (50 g/L) mais pas par une augmentation des acides aminés libres (Vera Pingitore et al. 2009). Les effets de ces paramètres dépendent cependant de la souche et du type de bactériocine. Les milieux MM et M17 contiennent du lactose tandis que le glucose est utilisé comme source unique de carbone dans le milieu CAS. Il est donc possible que la source de carbone ait un impact sur l'activité bactériocine. Cependant, si Hyink et al. (2007) ont montré que le saccharose favorise la production de salivaricines par *S. salivarius* K12, ils n'ont pas noté de différence entre le glucose et le lactose.

Un effet lié à la souche test peut également être évoqué. En effet, si le test « spot-on-lawn » de mesure de l'activité bactériocine permet de mettre en évidence une production de salivaricines actives contre la souche *Lb. sakei* ATCC 15521 en milieu M17 et mixte, il ne permet pas de conclure quand à la production de bactériocine en milieu CAS. Il est en effet possible qu'une bactériocine soit produite, mais qu'elle soit inactive contre la souche test dans ce milieu.

Dans le futur, il serait intéressant d'utiliser cette même méthode mais avec une souche test du pathogène *S. pyogenes*, qui est l'espèce reconnue la plus sensible aux bactériocines de *S. salivarius* K12 (Tagg et al. 2004). Le laboratoire n'étant pas équipé pour manipuler les pathogènes, cela n'a pas pu être fait dans le cadre de cette étude. En complément, des analyses protéomique ou transcriptomique pourraient permettre de détecter la production de bactériocines, même inactives. Enfin, certains auteurs ayant remarqué que la production est plus efficace en milieu solide qu'en culture liquide (Ross et al. 1993), et *S. salivarius* étant présent dans la salive, il pourrait être intéressant de tester cette activité à partir de cultures liquides en utilisant d'autres méthodes de détection.

#### **IV.1.4 Conclusion sur l'adaptation de *S. salivarius* K12 au milieu salive artificielle**

Afin de comprendre comment la bactérie *S. salivarius* s'implante dans un milieu composé de salive artificielle complétée, la croissance, la maintenance, l'état physiologique, le protéome et l'activité bactériocine de *S. salivarius* K12 ont été évalués dans trois milieux (CAS, M17 et milieu mixte), et à trois niveaux d'étude :

- ✓ Au niveau de la population, par des mesures de cultivabilité, des cinétiques de consommation de substrats et de synthèse de produits, de suivi de l'acidification via la consommation de neutralisant et de quantification de l'activité bactériocine ;
- ✓ Au niveau de la cellule, par des mesures du pH intracellulaire, de la dépolarisation membranaire, de vitalité cellulaire, de la viabilité et de la mortalité des cellules ;
- ✓ Au niveau moléculaire, par l'analyse des protéines exprimées différemment après 25 h de culture en milieu mixte et en milieu CAS.

La combinaison de ces résultats permet de démontrer que la salive artificielle complétée créée dans cette étude permet d'obtenir un taux de croissance très rapide de *S. salivarius* K12, équivalent à celui obtenu sur milieu M17. En revanche, ce milieu ne permet pas aux cellules de produire de bactériocines actives contre *Lb. sakei*, alors qu'elles sont synthétisées en milieu M17. En outre, en milieu CAS, *S. salivarius* arrête sa croissance de façon précoce, avant la consommation complète des sucres. Ce phénomène est expliqué par une inhibition plus marquée par l'acide lactique en milieu salive, ainsi que par le passage précoce des cellules en phase de maintenance, ce qui leur permet d'affecter l'énergie intracellulaire au maintien de leur viabilité et de la force proton motrice, malgré une perturbation des systèmes de transports actifs illustrée par

la baisse de la vitalité cellulaire. En revanche, en fin de phase stationnaire, lorsque les sucres sont épuisés, la viabilité chute fortement. Sur la base des résultats de l'analyse protéomique, ce comportement est principalement expliqué par une synthèse moindre de protéines impliquées dans le métabolisme énergétique et du glycogène, en milieu CAS par rapport au milieu mixte.

Ainsi, ces résultats permettent de conclure que le milieu salive artificielle complétée est un bon milieu pour la croissance de *S. salivarius* K12, mais que sa survie en phase stationnaire est affectée par rapport à un milieu plus riche. En revanche, ce milieu ne semble pas adapté pour la production de bactériocines actives. Cette étude constitue une première étape pour la compréhension de l'adaptation de *S. salivarius* dans la bouche. Il importe maintenant d'étudier l'influence des facteurs environnementaux rencontrés dans la cavité orale, sur le développement et la maintenance de *S. salivarius*.



## **IV.2 Effet des facteurs environnementaux sur le comportement de *S. salivarius* K12 cultivé en salive artificielle complétementée**

### **IV.2.1 Contexte et objectifs de l'étude**

Les résultats présentés dans la partie IV.1 ont montré que la salive artificielle complétementée par une solution repas permet la croissance, et à un moindre degré, la maintenance de *S. salivarius* K12. Cependant, l'étude bibliographique a dévoilé que dans la bouche, de nombreux autres facteurs influent sur la croissance des bactéries orales. Il s'agit notamment de la température, du pH, de certains composés salivaires antibactériens, du potentiel redox et de la disponibilité en nutriments.

Cette deuxième partie de la thèse a pour objectif d'analyser les effets de cinq de ces facteurs environnementaux, sur la croissance et l'état physiologique de *S. salivarius* K12. Trois enzymes salivaires ont été testées : deux d'entre elles ont un potentiel antibactérien direct, le lysozyme et la peroxidase, tandis que l'amylase a plutôt une action indirecte en facilitant la clairance bactérienne. L'impact d'une aération du milieu de culture avec un gaz ayant la même composition que l'air expiré (air enrichi en CO<sub>2</sub>) est également étudié, afin d'évaluer l'effet des variations du potentiel d'oxydoréduction sur *S. salivarius*. Enfin, le régime alimentaire de l'hôte est pris en compte, par l'étude de l'effet d'un apport de saccharose, à deux concentrations. Pour chaque condition environnementale, les résultats seront comparés à ceux acquis lors d'une culture en salive artificielle complétementée de référence, en considérant les cinétiques de croissance et de variation du potentiel redox, ainsi que l'évolution de la viabilité et de la mortalité cellulaire au cours de la culture.

Les résultats obtenus font l'objet d'une seconde publication, parue dans « Archives of Microbiology » (Roger et al. 2011b), constituant la partie IV.2.2, et d'un paragraphe complémentaire (IV.2.3) sur l'effet du saccharose.

## **IV.2.2 Les enzymes salivaires et l'air expiré affectent la croissance et l'état physiologique de *Streptococcus salivarius* dans une salive artificielle complétementée**

### ***IV.2.2.1 Résumé***

Pour mieux comprendre les phénomènes régissant l'implantation de la bactérie orale *Streptococcus salivarius* dans la bouche, l'effet de plusieurs facteurs environnementaux est étudié, dans une salive artificielle complétementée, associée à des conditions de pH et de température simulant celles rencontrées dans la cavité buccale. Les effets de trois enzymes salivaires (la peroxidase, le lysozyme et l'amylase) à leur concentration physiologique, ainsi que d'une injection d'air expiré ont été testés. L'injection d'air contenant 5% de CO<sub>2</sub> et 16% d'O<sub>2</sub> a un impact négatif sur la croissance et la viabilité de *S. salivarius* K12, conséquence d'une augmentation du potentiel d'oxydoréduction dans le milieu. L'addition de lysozyme affecte légèrement l'état physiologique de *S. salivarius* en altérant l'intégrité membranaire. A l'inverse, l'ajout de peroxidase n'est pas négatif puisqu'il permet de diminuer le potentiel redox. Enfin, l'addition d'amylase réduit le taux de croissance de *S. salivarius*, à cause de la formation d'un complexe entre la bactérie, l'amylase et les mucines, mais permet d'atteindre une biomasse finale élevée, conséquence de la dégradation enzymatique de nutriments. Finalement, ce travail montre que les enzymes salivaires ont un impact faible sur le comportement de *S. salivarius*. Cette bactérie est bien adaptée aux conditions buccales, puisqu'elle est capable de se développer en présence des enzymes salivaires, même si elle est affectée par la circulation d'air expiré, en raison d'une augmentation du potentiel redox.

Mots clés : *Streptococcus salivarius*, état physiologique, enzymes salivaires, salive artificielle, potentiel redox, taux de croissance

### ***IV.2.2.2 Publication***

## Salivary enzymes and exhaled air affect *Streptococcus salivarius* growth and physiological state in complemented artificial saliva

P. Roger · S. Harn-Arsa · J. Delettre · C. Béal

Received: 17 June 2011 / Revised: 25 July 2011 / Accepted: 5 August 2011  
© Springer-Verlag 2011

**Abstract** To better understand the phenomena governing the establishment of the oral bacterium *Streptococcus salivarius* in the mouth, the effect of some environmental factors has been studied in complemented artificial saliva, under oral pH and temperature conditions. Three salivary enzymes at physiological concentrations were tested: peroxidase, lysozyme and amylase, as well as injection of exhaled air. Injection of air containing 5% CO<sub>2</sub> and 16% O<sub>2</sub> induced a deleterious effect on *S. salivarius* K12, mainly by increasing redox potential. Addition of lysozyme slightly affected the physiological state of *S. salivarius* by altering membrane integrity. In contrast, peroxidase was not detrimental as it made it possible to decrease the redox potential. The addition of amylase reduced the specific growth rate of *S. salivarius* by formation of a complex with amylase and mucins, but led to high final biomass, as a result of enzymatic degradation of some nutrients. Finally, this work demonstrated that salivary enzymes had a slight impact on *S. salivarius* behaviour. It can thus be concluded that this bacterium was well adapted to in-mouth conditions, as it was able to resist certain salivary enzymes, even if tolerance to expired air was affected, as a result of an increased redox potential.

**Keywords** *Streptococcus salivarius* · Physiological state · Salivary enzymes · Artificial saliva · Redox potential · Growth rate

Communicated by Erko Stackebrandt.


P. Roger · S. Harn-Arsa · J. Delettre · C. Béal (✉)  
AgroParisTech, INRA, UMR 782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires, CBAL, 78850 Thiverval-Grignon, France  
e-mail: beal@grignon.inra.fr

### Introduction

Saliva has many functions in the mouth such as lubrication of oral mucous membranes, buffering action, maintenance of tooth integrity, enhancement of taste and digestion, and protection of teeth and mucosal surfaces (Mandel 1987). Through these functions, saliva strongly interacts with microorganisms in the mouth. Due to its quick turnover linked to continuous saliva production and swallowing, it allows the oral cavity to maintain a relatively constant bacterial balance, thus limiting pathogen development (Mandel 1987). This phenomenon is enhanced by several salivary components such as mucins, amylase, statherin and agglutinins, which aggregate the bacteria including streptococci, thus helping them to be flushed out of the oral cavity (Kilian and Nyvad 1990). Another saliva protection role is linked to its content in specific antimicrobial factors such as lysozyme, peroxidase and others. Lysozyme hydrolyses bond between *N*-acetylmuramic acid and *N*-acetylglucosamine in the peptidoglycan layer of the bacterial cell wall, thus causing cell lysis (Masschalck and Michiels 2003). The peroxidase in saliva has a dual activity. It catalyses the oxidation of salivary thiocyanate ions to antimicrobial compounds such as hypothiocyanite (OSCN<sup>-</sup>) (Carlsson et al. 1983). It also consumes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to form H<sub>2</sub>O, thus protecting host cells and bacteria from the oxidative effect of hydrogen peroxide. This mechanism is of particular interest for lactic acid bacteria, such as streptococci, that are known to lack the enzyme catalase, thus being strongly inhibited by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Thomas et al. 1994).

On the basis of this information, it can be deduced that many salivary components interact with microorganisms in the mouth, particularly with pathogens, thus contributing to oral health. However, they probably also affect the commensal oral microflora and, notably, the commensal lactic

Published online: 03 September 2011

 Springer



acid bacterium *Streptococcus salivarius*. In the mouth, it represents about 50% of total streptococci on the tongue and in whole saliva (Gibbons et al. 1964), and some *S. salivarius* strains display probiotic properties in the oral cavity (Tagg et al. 2004; Burton et al. 2006).

In addition to salivary enzymes, *S. salivarius* encounters exhaled air that contains between 12 and 16% oxygen in addition to 4–8% carbon dioxide (Morris 1979). By considering that *S. salivarius* is a facultative anaerobe that does not possess a catalase, this atmospheric condition negatively affects its growth (Shimamoto et al. 1990; Bradshaw et al. 1996). This deleterious effect is ascribed either to the formation of hydrogen peroxide (Carlsson et al. 1983; Garcia-Mendoza et al. 1993) or to an increase in redox potential (Eh) (Cachon et al. 2002). Moreover, the sensitivity of oral bacteria to oxygen is increased in a basal medium, as compared to richer media (Leke et al. 1999).

Better knowledge about the effects of salivary components and atmosphere on the behaviour of *S. salivarius* is required in order to better understand how this bacterium is used in oral-like conditions. Within this context, this work aims at studying the effects of amylase, lysozyme and peroxidase on the growth and physiological state of the oral strain *S. salivarius* K12 in artificial saliva (Roger et al. 2011), under oral pH and temperature conditions. The impact of continuous gas addition, mimicking exhaled air, will also be considered.

## Materials and methods

### Bacterial strain and media

*Streptococcus salivarius* K12 (BLIS Technologies Ltd, Dunedin, New Zealand) was used in this study. Frozen cells were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  in M17 broth (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) supplemented with 15% glycerol. Cells were pre-cultured twice, for 24 and 15 h, in M17 broth at  $37^{\circ}\text{C}$ . Inoculation was done at  $1 \times 10^6$  CFU  $\text{mL}^{-1}$ . The culture medium used in this study was artificial saliva complemented with a representative meal that was composed of  $5 \text{ g L}^{-1}$  glucose (Merck, Darmstadt, Germany) and  $1.4 \text{ g L}^{-1}$  meat extract (Biokar Diagnostics), and was defined as CAS (complemented artificial saliva) medium (Roger et al. 2011).

### Fermentation conditions

Cultures were grown with agitation at 150 rpm in a 2.2-L fermentor (LSL Biolafitte, St-Germain-en-Laye, France) having a 1.5-L working volume. Environmental conditions were chosen as  $37^{\circ}\text{C}$  (mouth temperature) and pH 6.7

(mean value of human saliva pH). The pH was controlled by automatic addition of 2 M KOH, and the redox potential (Mettler-Toledo, Bussigny, Switzerland) was monitored continuously.

According to the experimental design, the following enzymes were independently added to the fermentation medium:  $300 \text{ U mL}^{-1}$   $\alpha$ -amylase (from *Bacillus* sp., Sigma-Aldrich),  $700 \text{ U mL}^{-1}$  lysozyme (from chicken egg white, Sigma-Aldrich) or  $0.8 \text{ mU mL}^{-1}$  peroxidase (from horseradish, Sigma-Aldrich) with  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  of KSCN (Sigma-Aldrich). Even if enzymes concentrations vary in saliva, they were set up at average values calculated from previous works (Gandara et al. 1987; Lahteenmaki et al. 2000; Lee et al. 2007). In order to test the effect of exhaled air,  $6 \text{ L h}^{-1}$  of a gas composed of 79% nitrogen, 15% oxygen and 5% carbon dioxide (Air Liquide, Paris, France) was introduced into the culture medium throughout fermentation.

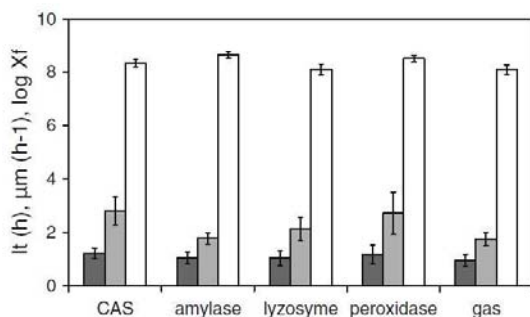
### Measurement of cultivability, viability and mortality

Cultivability was evaluated by plate counts. Cells were plated onto M17 agar (Biokar Diagnostics) and incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 24 h under anaerobic conditions (Genbox 96124, bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). Each result was the geometrical mean of at least three counts. Growth curves were fitted using a non-linear model, according to Zwietering et al. (1990). This model made it possible to determine three parameters to describe growth: maximal specific growth rate ( $\mu$  in  $\text{h}^{-1}$ ), lag time ( $I_t$  in h) and maximal cultivability ( $\ln X_f$ ). Statistical analyses were carried out with Statgraphics/Plus/Version 3.0 software (Statistical Graphics Corp., Rockville, MD, USA).

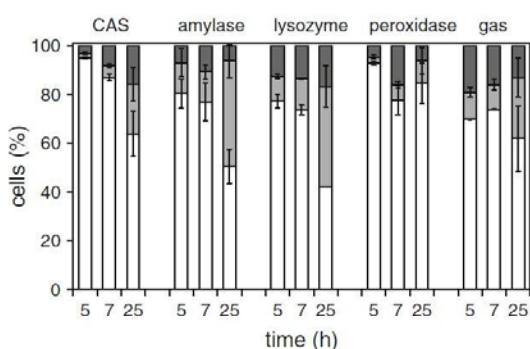
Dual staining using carboxyfluorescein diacetate (cFDA) and propidium iodide (PI) made it possible to differentiate viable, dead and damaged cells of *S. salivarius* K12 (Rault et al. 2007). cFDA was used to assess the level of esterase activity, and the nucleic acid dye PI made it possible to quantify cells with damaged membranes. Cell suspensions were diluted in Mac Ilvaine buffer, pH 7.3 ( $0.2 \text{ mol L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $0.01 \text{ mol L}^{-1}$  citric acid), to reach  $1 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$ . One mL of the diluted suspension was supplemented with  $5 \mu\text{L}$  PI ( $1.496 \text{ mmol L}^{-1}$  in distilled water, Sigma-Aldrich) and  $10 \mu\text{L}$  of V8 commercial solution (cFDA Chemchrome V8, AES Chemunex Inc., Ivry sur Seine, France) diluted ten times in acetone. After incubation for 15 min at  $40^{\circ}\text{C}$ , analysis was performed by flow cytometry on a CyFlow<sup>®</sup> space cytometer (Partec GmbH, Münster, Germany) with the aid of statistical tables given by FloMax<sup>®</sup> Software (Partec GmbH). Numbers (in cells  $\text{mL}^{-1}$ ) and percentages of stained cells were determined. Each result corresponded to the mean of at least four measurements.

## Results and discussion

The growth of *S. salivarius* K12 was quantified by cultivability and viability measurements. Non-linear regressions were established from cultivability measurements and corresponding parameters are summarised in Fig. 1. Viability measurements were done in early (5 and 7 h) and advanced stationary phases (25 h culture), and ratios of viable, damaged and dead cells are presented in Fig. 2. As a general rule, it was observed that the specific growth rate of *S. salivarius* was high ( $2.2 \pm 0.5 \text{ h}^{-1}$ ), regardless of the conditions used, and that lag time did not differ according to culture conditions. This high  $\mu_m$  value was ascribed to the ability of this species to rapidly adapt itself to mouth conditions, as previously observed by Roger et al. (2011). Nevertheless, depending on environmental conditions, specific growth rate, final cultivability, and viability and mortality rates varied, as discussed below.



**Fig. 1** Parameters characterising the growth curves of *S. salivarius* K12 in complemented artificial saliva medium (CAS), CAS with amylase, CAS with lysozyme, CAS with peroxidase and CAS with injection of air containing 5%  $\text{CO}_2$  and 16%  $\text{O}_2$  (gas). Lag time (dark shaded bar),  $\mu_m$  in  $\text{h}^{-1}$ , maximal growth rate (light shaded bar,  $\mu_m$  in  $\text{h}^{-1}$ ) and maximal cultivability (empty bar, log Xi) were calculated from growth curves and associated 95% confidence intervals



**Fig. 2** Relative percentages of viable (empty bar), damaged (light shaded bar) and dead (dark shaded bar) cells measured at 5-h, 7-h and 25-h culture of *S. salivarius* K12 in complemented artificial saliva medium (CAS), CAS with amylase, CAS with lysozyme, CAS with peroxidase and CAS with injection of air containing 5%  $\text{CO}_2$  and 16%  $\text{O}_2$  (gas) and associated standard deviations

## Influence of amylase on *S. salivarius*

On the basis of Fig. 1, final biomass concentration was twice as high in the presence of amylase ( $4.5 \pm 1.4 \times 10^8 \text{ CFU mL}^{-1}$  vs.  $2.2 \pm 0.7 \times 10^8 \text{ CFU mL}^{-1}$  in CAS medium), whereas lag time remained unchanged. This high level of biomass could be explained by the glycosidic activity of amylase that can make some complex components found in meat extract or in mucin available. Oral streptococci, in fact, only partially degrade mucin oligosaccharides, because they do not have the appropriate enzymes for complete hydrolysis (Van der Hoeven and Camp 1991). In contrast, the specific growth rate was lower ( $1.8 \pm 0.2 \text{ h}^{-1}$ ), when amylase was added at physiological concentrations ( $300 \text{ U mL}^{-1}$ ) than in CAS medium without amylase ( $2.8 \pm 0.5 \text{ h}^{-1}$ ). Moreover, Fig. 2 showed that cell viability at 5-h culture was slightly lower with amylase ( $80 \pm 6\%$ ) than without ( $95 \pm 1\%$ ).

These slight inhibitory effects on viability and specific growth rate could be linked to the formation of a bacteria–mucin–amylase complex. It was demonstrated that mucins can form a complex with amylase (Iontcheva et al. 1997), and that some strains of oral streptococci, including *S. salivarius* strains, were able to bind to salivary  $\alpha$ -amylase (Kilian and Nyvad 1990). This possible aggregation between bacteria, amylase and mucin could limit the access to some nutrients during the growth phase, thus reducing the specific growth rate and decreasing the viability rate.

## Impact of lysozyme on *S. salivarius*

From Fig. 1, lag time, specific growth rate and final biomass concentration were similar with and without  $700 \text{ U mL}^{-1}$  lysozyme added to CAS medium, when considering 95% confidence intervals. Nevertheless, as shown in Fig. 2, cellular mortality in the early stationary phase increased with lysozyme ( $13 \pm 1\%$  instead of  $3 \pm 1\%$  in CAS medium at 5 h), even if it remained stable throughout the stationary phase.

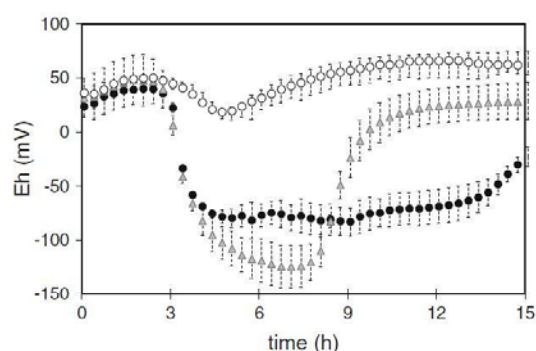
This result could be partly explained by the bactericidal effect of lysozyme on microorganisms. This inhibition targets the cell wall and membrane, either by muramidase activity of lysozyme that damages the cell wall or by stimulation of cellular autolysins that alters the cellular membrane (Masschalck and Michiels 2003). The high level of cells showing propidium iodide fluorescence confirmed that these events occurred in *S. salivarius* K12. Nevertheless, the bactericidal effect of lysozyme remained limited, since final biomass concentration and viability in the advanced stationary phase were not significantly affected. This limited impact could be explained by three reasons. Firstly, the potassium and magnesium concentrations of artificial saliva (21 and  $0.4 \text{ mmol L}^{-1}$ , respectively) may reduce lysozyme inhibition (Wang and Germaine 1993).

Secondly, a degradation of lysozyme by *S. salivarius* can occur during the culture, as previously observed by Dumas et al. (1987) with oral bacteria of mice. Finally, an adaptation of this oral bacterium to lysozyme could be proposed, as a result of the production of a muramidase-resistant peptidoglycan, as formerly demonstrated by Masschalck and Michiels (2003) on Gram-positive bacteria.

#### Effect of peroxidase on *S. salivarius*

Adding peroxidase ( $0.8 \text{ mU mL}^{-1}$ ) at physiological concentration in complemented artificial saliva medium positively influenced the viability of *S. salivarius* K12. On the basis of Figs. 1 and 2, even if specific growth rate, lag time and cultivability were not affected, viability was significantly improved in the advanced stationary phase, when peroxidase was added. The percentage of viable cells was  $85 \pm 9\%$ , instead of  $64 \pm 8\%$  in CAS medium.

Hydrogen peroxide is known to be produced by streptococci (Carlsson et al. 1983; Garcia-Mendoza et al. 1993) and ranges between 8 and  $13 \mu\text{M}$  in whole saliva (Pruitt et al. 1986). In the presence of peroxidase, the  $\text{H}_2\text{O}_2$  level is reduced in the environment, as shown by the stronger decrease in redox potential in CAS medium with peroxidase, as compared to CAS medium alone (Fig. 3). By considering that  $\text{H}_2\text{O}_2$  has an inhibiting effect on *S. salivarius* as it does on other oral streptococci (Thomas et al. 1994), addition of peroxidase improved *S. salivarius* physiological state, as shown by viability results, and this improvement was a consequence of hydrogen peroxide consumption. The reaction of peroxidase with  $\text{SCN}^-$  (Carlsson et al. 1983; Thomas et al. 1994) was not considered in this study, as horseradish peroxidase does not react with this compound at pH 6.7 (Modi et al. 1991). This



**Fig. 3** Time course of redox potential (Eh) during fermentations of *S. salivarius* K12 performed in complemented artificial saliva medium (CAS) (filled circle), CAS with injection of air containing 5%  $\text{CO}_2$ , 16%  $\text{O}_2$ , 79%  $\text{N}_2$  (open circle), CAS with peroxidase (triangle), and associated standard deviations

has to be considered in the future, to better mimic human oral conditions.

#### Consequences of exhaled air injection on *S. salivarius*

When expired air containing 5%  $\text{CO}_2$  and 16%  $\text{O}_2$  was sparged into the fermentor at a rate of  $6 \text{ L h}^{-1}$ , the specific growth rate of *S. salivarius* K12 significantly decreased ( $1.8 \pm 0.3 \text{ h}^{-1}$ ), as compared to that observed without gas ( $2.8 \pm 0.5 \text{ h}^{-1}$ ) (Fig. 1). Lag time and maximal bacterial concentration were not affected, but viability was weakened at 5- and 7-h culture. By considering that the accumulation of oxidative compounds may explain this behaviour, redox potential (Eh) was measured throughout the cultures. As shown on Fig. 3, after 3-h culture, Eh became negative (+40 to  $-80 \text{ mV}$ ) when no gas was sparged, whereas it remained positive (+18 to +65 mV) with expired air, because of oxygen injection. Since pH was controlled in our study, this positive Eh value was only the consequence of gas injection and was not related to pH variation (Cachon et al. 2002).

In the absence of gas injection, Eh variation was ascribed to oxygen consumption. When gas was introduced into the fermentor, more oxygen was brought into the medium and reactive oxygen species (ROS) may have appeared. Since *S. salivarius* belongs to the streptococci group, it is a facultative anaerobe and does not possess a catalase, which explained that growth rate and viability were negatively affected. Nevertheless, since lag time, maximal cultivability and viability in the late stationary phase were unchanged, this negative effect of gas was limited. On the basis of these results, it was concluded that *S. salivarius* K12 was slightly affected by exhaled air containing 5%  $\text{CO}_2$  and 16%  $\text{O}_2$ . These results are in agreement with those obtained by Shimamoto et al. (1990) who obtained a similar final biomass but a lower growth rate of *S. mutans* during growth under aerobic instead of anaerobic conditions. They are strengthened by those of Bradshaw et al. (1996), who demonstrated that streptococci remained dominant in a mixed bacterial culture when adding air containing 5%  $\text{CO}_2$  and 16%  $\text{O}_2$ . This behaviour was linked to a redox potential that was comprised between +90 and +140 mV during the culture, thus indicating that this species was able to grow in the presence of oxygen. This phenomenon is very useful for this bacterium, because redox potential is positive on the tongue as a result of oxygen concentration that ranges between 12 and 16% in the mouth (Morris 1979). As an explanation of this weak resistance of *S. salivarius* to oxygen, it should be considered that, like many anaerobes, this species synthesises specific enzymes to protect itself from oxygen toxicity. Among them, NADH oxidase (REFSEQ: ZP\_04062198.1 *S. salivarius* SK126, NCBI) was shown to protect *S.*

*mutans* from oxygen by producing hydrogen peroxide and water (Higuchi 1992). In addition, superoxide dismutase (REFSEQ: NZ\_ACLO01000032.1, *S. salivarius* SK126, NCBI) was used by *S. mutans* and *Lactobacillus sake* in response to oxidative stress to convert superoxide anions into H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Morris 1979; Amanatidou et al. 2001).

## Conclusion

Our study provides data to characterise the effects of exhaled air and three enzymes contained in saliva on the growth and physiological state of *S. salivarius*, a commensal lactic acid bacterium in the mouth. Amylase induced a reduction in the specific growth rate that was explained by the formation of a complex between amylase, mucin and bacteria, whereas it induced an increase in final biomass concentration due to better availability of some substrates. Lysozyme slightly affected the viability of *S. salivarius* K12 as a result of partial degradation of the cellular membrane. Peroxidase had a stimulatory effect, which was ascribed to the decrease in redox potential. Finally, injection of air containing 5% CO<sub>2</sub> and 16% O<sub>2</sub> led to decreased growth rate and viability of *S. salivarius* K12, because of the increase in redox potential during fermentation. From these results, it was concluded that redox potential was a key environmental factor, which should be taken into account when considering growth and physiological state of oral bacteria. In the future, the effects of real saliva enzymes (such as salivary lactoperoxidase, lipase) and other saliva components (such as lactoferrin, histatin) will be studied, at different physiological concentrations, in order to encompass all oral conditions. Moreover, continuous cultures will be carried out in artificial saliva containing salivary enzymes and under injection of exhaled air, to more effectively mimic the dynamics of the oral cavity.

## References

- Amanatidou A, Bennik M, Gorris L, Smid EJ (2001) Superoxide dismutase plays an important role in the survival of *Lactobacillus sake* upon exposure to elevated oxygen. Arch Microbiol 176:79–88
- Bradshaw DJ, Marsh PD, Allison C, Schilling KM (1996) Effect of oxygen, inoculum composition and flow rate on development of mixed-culture oral biofilms. Microbiology 142:623–629
- Burton JP, Chilcott CN, Moore CJ, Speiser G, Tagg JR (2006) A preliminary study of the effect of probiotic *Streptococcus salivarius* K12 on oral malodour parameters. J Appl Microbiol 100:754–764
- Cachon R, Jeanson S, Aldarf M, Divies C (2002) Characterisation of lactic starters based on acidification and reduction activities. Lait 82:281–288
- Carlsson J, Iwami Y, Yamada T (1983) Hydrogen peroxide excretion by oral streptococci and effect of lactoperoxidase–thiocyanate–hydrogen peroxide. Infect Immun 40:70–80
- Dumas C, Champagne A, Lavoie MC (1987) Proteolytic activity of bacteria isolated from the oral cavities of BALB/c mice toward salivary proteins. J Dent Res 66:62–64
- Gandara BK, Izutsu KT, Truelove EL, Mandel ID, Sommers EE, Ensign WY (1987) Sialochemistry of whole, parotid, and labial minor gland saliva in patients with oral lichen planus. J Dent Res 66:1619–1622
- Garcia-Mendoza A, Liebana J, Castillo AM, de la Higuera A, Piedrola G (1993) Evaluation of the capacity of oral streptococci to produce hydrogen peroxide. J Med Microbiol 39:434–439
- Gibbons RJ, Kapsimalis B, Socransky SS (1964) The source of salivary bacteria. Arch Oral Biol 9:101–103
- Higuchi M (1992) Reduced nicotinamide adenine-dinucleotide oxidase involvement in defense against oxygen-toxicity of *Streptococcus mutans*. Oral Microbiol Immunol 7:309–314
- Iontcheva I, Oppenheim FG, Troxler RF (1997) Humans salivary mucin MG1 selectively forms heterotypic complexes with amylase, proline-rich proteins, statherin, and histatins. J Dent Res 76:734–743
- Kilian M, Nyvad B (1990) Ability to bind salivary alpha-amylase discriminates certain viridans group streptococcal species. J Clin Microbiol 28:2576–2577
- Lahteenmaki MT, Salo MS, Tenovuo JO, Helminen AV, Vilja PJ, Huupponen RK (2000) The effects of glycopyrrolate on oral mucous host defenses in healthy volunteers. Anesth Analg 91:467–472
- Lee JY, Chung JW, Kim YK, Chung SC, Kho HS (2007) Comparison of the composition of oral mucosal residual saliva with whole saliva. Oral Dis 13:550–554
- Leke N, Grenier D, Goldner M, Mayrand D (1999) Effects of hydrogen peroxide on growth and selected properties of *Porphyromonas gingivalis*. FEMS Microbiol Lett 174:347–353
- Mandel ID (1987) The functions of saliva. J Dent Res 66:623–627
- Masschalck B, Michiels CW (2003) Antimicrobial properties of lysozyme in relation to foodborne vegetative bacteria. Crit Rev Microbiol 29:191–214
- Modi S, Behere DV, Samaresh M (1991) Horseradish peroxidase catalyzed oxidation of thiocyanate by hydrogen peroxide: comparison with lactoperoxidase-catalysed oxidation and role of distal histidine. Biochim Biophys Acta 1080:45–50
- Morris JG (1979) Oxygen and growth of the oral bacteria. In: Kleinberg I, Ellison SA, Mandel ID (eds) Saliva and dental caries: proceedings of a workshop on saliva and dental caries, School of Dental Medicine, Health Sciences Center, State University of New York at Stony Brook, Stony Brook, June 5–7 1978. Information Retrieval Inc., New York. ISBN: 0917000064
- Pruitt KM, Tenovuo J, Mansson-Rahemtulla B, Harrington P, Baldone DC (1986) Is thiocyanate peroxidation at equilibrium in vivo? Biochim Biophys Acta 870:385–391
- Rault A, Béal C, Ghorbal S, Ogier JC, Bouix M (2007) Multiparametric flow cytometry allows rapid assessment and comparison of lactic acid bacteria viability after freezing and during frozen storage. Cryobiology 55:35–43
- Roger P, Delettre J, Bouix M, Béal C (2011) Characterization of *Streptococcus salivarius* growth and maintenance in artificial saliva. J Appl Microbiol 111:631–641
- Shimamoto T, Fukui K, Kodama T, Shimono T, Ohta H, Kato K (1990) Effects of oxygen on growth of *Streptococcus mutans*. Shika Kiso Igakkai Zasshi 32:10–19
- Tagg JR, Dierksen KP, Upton M (2004) Lantibiotic. US Patent 6773912 B1
- Thomas EL, Milligan TW, Joyner RE, Jefferson MM (1994) Antibacterial activity of hydrogen peroxide and the

- lactoperoxidase–hydrogen peroxide–thiocyanate system against oral streptococci. *Infect Immun* 62:529–535
- Van der Hoeven JS, Camp PJ (1991) Synergistic degradation of mucin by *Streptococcus oralis* and *Streptococcus sanguis* in mixed chemostat cultures. *J Dent Res* 70:1041–1044
- Wang YB, Germaine GR (1993) Effects of pH, potassium, magnesium, and bacterial growth phase on lysozyme inhibition of glucose fermentation by *Streptococcus mutans* 10449. *J Dent Res* 72:907–911
- Zwietering MH, Jongenburger I, Rombouts FM, Van't Riet K (1990) Modeling of the bacterial growth curve. *Appl Environ Microbiol* 56:1875–1881

## **IV.2.3 Effet de l'ajout de saccharose sur la croissance et l'état physiologique de *S. salivarius* K12 en milieu salive artificielle complétementée**

### ***IV.2.3.1 Contexte et objectif de l'étude***

Dans la partie IV.2.2, l'effet de certains facteurs buccaux endogènes a été démontré et quantifié. Cependant, les bactéries orales sont également soumises à l'influence de facteurs exogènes, notamment le régime alimentaire de l'hôte ou ses pratiques hygiéniques. Si plusieurs travaux ont été conduits sur l'impact de ces pratiques, en particulier sur l'utilisation du fluor et de la chlorexidine sur les bactéries orales (Ahumada Ostengo et al. 2005; Hope and Wilson 2004), il n'y a aucune information sur le comportement de *S. salivarius* lors d'une modification environnementale brusque liée à l'ingestion des « repas » par l'hôte. Puisque le saccharose est un composant important dans les régimes alimentaires occidentaux, son effet sur la croissance et l'état physiologique de *S. salivarius* K12 est analysé dans cette étude, d'autant que, contrairement à *S. thermophilus*, *S. salivarius* est capable de le métaboliser (Burton et al. 2006b).

### ***IV.2.3.2 Méthodes et résultats***

Deux concentrations (1,25 et 12,5 g/L) de saccharose ont été successivement ajoutées dans le milieu salive artificielle complétementée (CAS). La croissance et la maintenance de *S. salivarius* K12 ont été caractérisées par des mesures de cultivabilité (Figure 23A), de concentration en acide lactique (Figure 23B), et d'évolution du nombre de cellules viables, endommagées et mortes (Figure 24) au cours de la culture. Les résultats obtenus en présence de saccharose sont comparés à ceux obtenus en son absence.

L'activité de l'eau ( $a_w$ ) liée à l'ajout de saccharose a été également mesurée : elle est similaire dans les trois milieux de culture ( $0,985 \pm 0,005$ ), indiquant ainsi qu'un stress osmotique n'est pas à considérer.

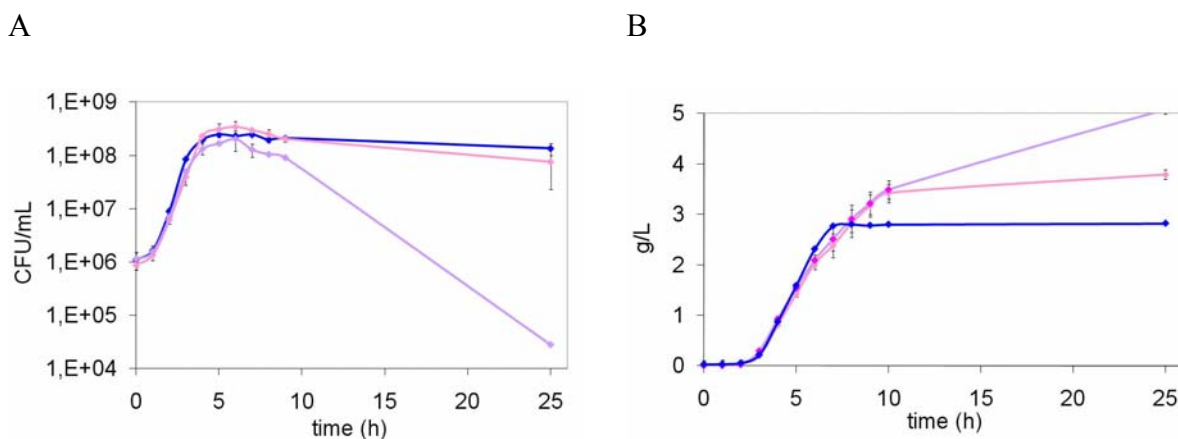


Figure 23 : Evolution de (A) la cultivabilité et (B) de la concentration en acide lactique en fonction du temps de culture en milieu CAS (●), en milieu CAS additionné de 1,25 g/L de saccharose (●), et en milieu CAS additionné de 12,5 g/L de saccharose (●).

La Figure 23A montre que le temps de latence ( $1,20 \pm 0,05$  h) et le taux de croissance ( $1,76 \pm 0,10$  h<sup>-1</sup>) de *S. salivarius* K12 sont similaires dans les trois milieux de culture. Dans les trois milieux, la cultivabilité en fin de phase exponentielle est également équivalente puisqu'elle atteint  $2,8 \pm 0,6 \cdot 10^8$  CFU/mL après 5 h de culture. En revanche, en phase stationnaire, la survie des bactéries diffère. En milieu CAS seul, la cultivabilité se maintient à sa valeur maximale jusqu'à 25 h de culture. Dans le milieu contenant 1,25 g/L de saccharose, la cultivabilité diminue jusqu'à  $7,5 \cdot 10^7$  CFU/mL en phase stationnaire avancée. Enfin, en présence de 12,5 g/L de saccharose, la concentration cellulaire chute de 4 log pour atteindre  $2,8 \cdot 10^4$  CFU/mL après 25 h de culture. En conséquence, si la croissance de *S. salivarius* K12 n'est pas affectée par le saccharose, sa maintenance est dégradée en présence du sucre, et ce, d'autant plus que la concentration est élevée.

Concernant l'évolution de la concentration en acide lactique, la Figure 23B montre qu'il n'y a pas de différence de vitesse de production d'acide lactique entre les trois conditions de culture. La concentration en acide lactique après 5 h de culture est similaire dans les trois milieux, mais elle diffère ensuite selon la concentration en saccharose apportée dans le milieu. Dans le milieu CAS sans saccharose, la quantité d'acide lactique se stabilise à 2,8 g/L après 7 h de culture, tandis que dans le milieu contenant 1,25 g/L de saccharose, elle atteint 3,8 g/L après 25 h de culture. En présence de 12,5 g/L de saccharose, la concentration en acide lactique est encore supérieure (5,1 g/L), même si elle n'est pas stabilisée après 25 h de culture. Finalement, ces résultats montrent que la production d'acide lactique est fortement affectée par la concentration en saccharose apportée dans les milieux.

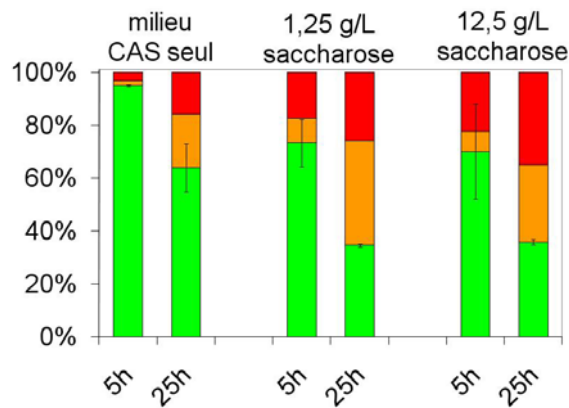


Figure 24 : Evolution des proportions de cellules viables (■) endommagées (■) et mortes (■), en fonction du temps de culture en milieu CAS, en milieu CAS additionné de 1,25 g/L de saccharose, et en milieu CAS additionné de 12,5 g/L de saccharose

La Figure 24 présente l'évolution de la viabilité et de la mortalité des cellules au cours des cultures de *S. salivarius* K12 réalisées en absence ou en présence de saccharose. Elle permet d'observer que le milieu CAS seul permet d'obtenir une proportion de cellules viables plus élevée, quelque soit le temps de culture considéré, que les milieux additionnés de saccharose. En revanche, il n'y a pas de différence significative entre les milieux contenant 1,25 ou 12,5 g/L de saccharose. Dans ces deux milieux, la viabilité se dégrade au cours de la culture, passant de  $71,7 \pm 1,5\%$  à 5 h de culture à  $35,3 \pm 0,7\%$  après 25 h, contre 95% (5 h) et 64% (25 h) en milieu CAS sans saccharose. En conséquence, la présence de saccharose dans la salive provoque une dégradation de la viabilité d'une proportion significative de cellules, indiquant ainsi que leur état physiologique est affecté.

#### IV.2.3.3 Discussion et conclusion

Les résultats obtenus montrent que l'addition de saccharose dans le milieu salive artificielle induit des modifications de l'état physiologique de *S. salivarius* K12, mais pas à tous les niveaux. La phase de croissance n'est pas affectée, comme le montrent les paramètres constants de temps de latence, de taux de croissance et de concentration en biomasse en fin de phase exponentielle. En revanche, en phase stationnaire, le comportement de la bactérie diffère en fonction de la concentration en saccharose : lorsque celle-ci augmente, la production d'acide lactique s'accroît, indiquant ainsi que le saccharose est consommé par les bactéries, comme précédemment démontré par Burton et al. (2006b). En parallèle, la mortalité augmente et la cultivabilité diminue, d'autant plus que la concentration en saccharose augmente. Ce résultat peut être mis en relation avec ceux obtenus précédemment (Roger et al. 2011a). En effet, il a été montré qu'une concentration élevée en acide lactique dans le milieu CAS impacte négativement la survie de *S.*



*salivarius* K12, car elle affecte son métabolisme énergétique. Ainsi, les conséquences négatives de l'addition de saccharose sont expliquées, indirectement, par l'accroissement de la concentration en acide lactique qu'elle génère.

#### **IV.2.4 Conclusion sur l'effet des facteurs environnementaux sur *S. salivarius* K12**

Les travaux réalisés dans cette deuxième partie de la thèse ont permis d'établir les effets de trois enzymes salivaires, l'amylase, la peroxidase et le lysozyme, d'un apport de saccharose, ainsi que d'une injection d'air expiré dans le milieu de culture, sur la croissance et la maintenance de *S. salivarius* K12.

Les résultats obtenus confirment tout d'abord le double rôle de l'amylase déjà décrit dans la bibliographie. En effet, la formation d'un complexe bactérie-amylase-mucine semble limiter l'accès des bactéries aux nutriments, diminuant ainsi leur taux de croissance, mais l'action enzymatique de l'amylase accroît par ailleurs la disponibilité des nutriments, entraînant ainsi une augmentation de la concentration en biomasse bactérienne finale. Ces analyses mettent également en évidence des différences dans le comportement de *S. salivarius* K12 vis-à-vis de deux enzymes à potentiel antibactérien. La présence de lysozyme provoque une dégradation de l'enveloppe bactérienne, à cause de son action sur le peptidoglycane. En revanche, l'ajout de peroxidase favorise la viabilité des cellules, ce qui s'explique par la diminution du potentiel redox qu'elle génère, conduisant à la mise en place de conditions réductrices plus adaptées aux exigences de cette bactérie anaérobie. Le rôle clé du potentiel redox sur la croissance et la maintenance de *S. salivarius* K12 est confirmé puisque l'injection d'air contenant 16% d'oxygène et 5% de dioxyde de carbone, qui provoque une augmentation du potentiel redox, se traduit par une baisse du taux de croissance et de la viabilité de *S. salivarius* K12. Enfin, les résultats obtenus en présence de saccharose montrent que la maintenance de *S. salivarius* K12 est négativement affectée par l'acide lactique qui en dérive et modifie le métabolisme énergétique.

Finalement, cette seconde partie de la thèse a permis de montrer que les principaux facteurs environnementaux rencontrés dans la cavité orale affectent différemment la croissance ou la maintenance de *S. salivarius* K12, et qu'il est donc nécessaire de les prendre en compte lors d'études ultérieures du comportement de cette bactérie ou lors de l'élargissement à d'autres bactéries orales.

## **IV.3 Etude en culture continue de la dynamique buccale sur *S. salivarius* K12**

### **IV.3.1 Contexte et objectifs de l'étude**

Les travaux présentés dans les deux premières parties de la thèse démontrent que les facteurs environnementaux caractéristiques de la cavité orale, notamment la salive, les nutriments, les enzymes salivaires et l'injection d'air expiré influent sur le comportement de *S. salivarius* K12. Or, d'après la synthèse bibliographique, le comportement des bactéries orales est également affecté par le taux de dilution rencontré dans la bouche (conséquence de la déglutition) et par l'alternance entre les périodes d'abondance et de carence nutritionnelle. Il est donc incontournable d'étudier l'impact de ces facteurs sur l'espèce *S. salivarius*, d'autant qu'aucune étude publiée ne s'y est intéressée.

Dans ce but, nous avons mis au point des cultures continues alimentées en milieu salive artificielle, avec apport programmé d'une solution nutritive deux fois par jour. Ce système permet de reproduire, *in vitro*, une alternance de moments de carence nutritionnelle, grâce au lessivage constant provoqué par la culture continue, et de périodes d'apport de nutriments. Pour se rapprocher encore davantage des conditions buccales, les flux salivaires (et donc les taux de dilution) ne sont pas constants mais varient au cours de la journée, pour simuler l'alternance des flux de salive stimulée, non stimulée et nocturne. La réponse de *S. salivarius* K12 à la culture continue et à cette alternance nutritionnelle est caractérisée par des mesures de cultivabilité et de viabilité cellulaire, associées à la mesure de consommation de KOH utilisé pour maintenir le pH. Enfin, une analyse comparative des transcriptomes obtenus en début et fin de phase stationnaire est effectuée, afin de comprendre comment *S. salivarius* K12 s'adapte aux conditions de carence.

Les résultats obtenus font l'objet d'une publication qui sera soumise prochainement.

## **IV.3.2 Réponses de *S. salivarius* aux conditions dynamiques buccales lors de cultures continues**

### ***IV.3.2.1 Résumé***

*Streptococcus salivarius* est une bactérie orale démontrant des fonctionnalités probiotiques. Afin de mieux comprendre les phénomènes qui régissent son implantation dans la cavité buccale, nous avons caractérisé la croissance, l'état physiologique et le transcriptome de la souche *S. salivarius* K12 dans des conditions reproduisant la dynamique rencontrée dans la bouche. Dans ce but, la bactérie a été cultivée en culture continue dans une "salive artificielle", avec un apport de nutriments deux fois par jour, et sous des conditions physiologiques de température, pH et atmosphère.

Les résultats obtenus montrent que *S. salivarius* K12 présente un taux de croissance élevé, ce qui lui permet d'assimiler rapidement les nutriments apportés et évite un lessivage des cellules. En condition de carence nutritionnelle, *S. salivarius* K12 se maintient à un niveau de cultivabilité et de viabilité relativement constant, et reprend sa croissance immédiatement après la réintroduction des substrats. Son pH intracellulaire est également maintenu tout au long de la culture. Ces résultats sont expliqués, au moins partiellement, par les données provenant des études transcriptomiques. Ces dernières montrent qu'après consommation complète du glucose, les cellules surexpriment encore des gènes impliqués dans la croissance, mais également des gènes en lien avec la réponse à la carence nutritionnelle. Après 14,5 h de carence nutritionnelle, des gènes relatifs à la compétence et la réparation de l'ADN sont surexprimés. Finalement, cette étude montre que *S. salivarius* K12 est bien adapté à sa niche écologique. Cette bactérie est capable de survivre à des périodes de carences simulant celles rencontrées au cours de la nuit et de reprendre rapidement sa croissance dès lors que des nutriments sont apportés, comme c'est le cas lors de la prise de repas. Dans le contexte réel de la bouche, il est probable que ces propriétés représentent un avantage lui permettant de s'implanter et de se maintenir.

### ***IV.3.2.2 Publication***

## Responses of *Streptococcus salivarius* to dynamic mouth-like conditions in continuous culture

Authors: Perrine Roger<sup>1</sup>, Eric Guédon<sup>2</sup>, Céline Gautier<sup>2</sup>, Nicolas Pons<sup>2</sup>, Catherine Béal<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>AgroParisTech - INRA - UMR 782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires, CBAI, 78850 Thiverval-Grignon, France. <sup>2</sup> INRA - Unité Micalis, Centre de Vilvert, 78950 Jouy-en-Josas, France

Keywords: artificial saliva; *Streptococcus salivarius*, continuous culture, starvation,

\*Corresponding author. Mailing address: AgroParisTech, INRA, UMR 782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires, CBAI, F-78850 Thiverval-Grignon, France. Phone: +33 (0)1 30 81 54 85. Fax: +33 (0)1 30 81 55 97. E-mail: [beal@grignon.inra.fr](mailto:beal@grignon.inra.fr).

### Abstract

*Streptococcus salivarius* is an oral lactic acid bacterium that displays beneficial effects. In order to better understand the phenomena that govern its establishment into the mouth, we aimed at characterizing the growth, physiological state and transcriptome of *S. salivarius* K12 by simulating the dynamic of the mouth. This dynamic was achieved with the aid of continuous cultures in an "artificial saliva" medium that was complemented twice a day with a representative meal, under physiological conditions of temperature, pH and atmosphere. Results demonstrated that *S. salivarius* K12 achieved high growth rate, which allowed the cells to quickly assimilate the nutrients and prevented them from wash out. Under starvation conditions, *S. salivarius* K12 maintained a constant level of cultivability and viability, and recovered growth immediately after nutrients supply. Intracellular pH was also maintained throughout the culture. These observations were partially explained by transcriptomic data. They demonstrated that, after glucose consumption, cells over-expressed genes involved in growth and in some starvation responses. After 14.5 h starvation, some genes related to competence and DNA repair were up-regulated. Finally, this study demonstrated that *S. salivarius* K12 was able to withstand periods of starvation and to quickly recover growth when nutrients were provided. It could thus be concluded that this bacterium was well adapted to its ecological niche.

## Introduction

The mouth is a dynamic system in which oral microorganisms are subjected to a specific environment. This environment is characterized by a continuous but variable production of saliva, a temperature ranging from 33.2 to 38.1 °C (44), an atmosphere that is mainly composed of expired air (16% oxygen, 5% carbon dioxide and 79% nitrogen) (49) and a pH comprised between 5.3 and 7.8 (13). These parameters are dependent on each individual. Saliva is composed of more than 99% water and a variety of electrolytes, proteins and other nitrogenous products (33). It also contains enzymes such as lysozyme and peroxidase, which provide an antibacterial action (28) and act on bacterial behavior (41). In the mouth, saliva is subjected to a quick turnover based on continuous saliva production and swallowing (28). Saliva flow varies according to circadian cycles: close to zero during the night, around 0.3 ml min<sup>-1</sup> during the day (unstimulated saliva) and comprised between 1 and 3 ml min<sup>-1</sup> during meals (stimulated saliva) (13).

As a consequence of these environmental conditions, more than 600 different species of oral microorganisms live into the mouth (1). Their presence is favored by endogenous nutrients (salivary proteins and components) and by exogenous intake during food consumption. De Jong et al. (12) demonstrate that saliva allows bacterial maintenance, whereas bacterial growth needs intake of glucose. As nutrient intake is temporary, Carlsson et al. (9) indicated that oral bacteria endure alternation of "feast and famine" periods. During starvation, *L. salivarius* and *S. anginosus* adapt themselves by entering into stationary phase and by inactivating some metabolic activities such as dehydrogenase activity (11). In artificial saliva, *S. salivarius* K12 stops growing before consuming all glucose, in order to accumulate energy to maintain intracellular pH and proton motive force during starvation (40). These physiological responses allow oral bacteria to survive for many days in starvation conditions (17, 39). Moreover, these microorganisms are well adapted to this alternation, as reactivation of metabolism and growth is very quick (11).

Effects of starvation and others environmental parameters on oral bacteria have been studied in planktonic continuous cultures and on biofilms (4, 5, 11). During oral liquid cultures, a dilution rate of 0.1-0.2 h<sup>-1</sup> is generally applied to mimic mouth conditions (4, 6, 25). Depending on the study, culture media are composed of artificial saliva containing salts and mucins, and added with nutrients to design a complemented artificial saliva (4, 40). During some continuous cultures, complementation of artificial saliva is achieved periodically by repeated pulses (6, 30). These studies mainly deal with harmful bacteria involved in caries processes, dental biofilms and mixed communities (4, 6, 30). One study is focused on pathogen lingual bacteria that are responsible for halitosis (34). To our knowledge, this approach has never been conducted with the commensal oral bacterium *Streptococcus salivarius*, alone or in mixed communities.

*Streptococcus salivarius* is the first commensal bacterium that establish in the newborn's oral cavity, where it colonizes the upper respiratory tract (1). According to Guglielmetti et al. (21), it efficiently adheres to the oral epithelial cells and represents more than 50% of the streptococci present on the tongue and 47% in saliva (18). Owing to these adherence properties and to the production of bacteriocins (salivaricins Sal A and Sal B), the strain *Streptococcus salivarius* K12 displays a probiotic potential in the oral cavity. It is particularly effective to counteract oral malodor, triggered by sulphur-containing proteinaceous compounds produced by gram-negative oral microorganisms (7), and to inhibit the pathogen specie *Streptococcus pyogenes*, the most common bacterial cause of pharyngitis in children (45, 46).

Based on this information, knowledge on the behavior of *S. salivarius* in oral cavity, by considering both environmental conditions and dynamic of saliva fluxes, is currently insufficient. This study aims at characterizing the growth, physiological state and transcriptomic responses of the strain *S. salivarius* K12 in artificial saliva, combined with mouth-like dynamic environmental conditions and nutrient intake.

## Materials and methods

### Bacterial strain and media

*Streptococcus salivarius* K12 (BLIS Technologies Ltd., Dunedin, New Zealand) was used in this study. Frozen cells were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  in M17 broth (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) supplemented with 15% glycerol. Cells were precultured twice, for 24 h and 15 h, in M17 broth at  $37^{\circ}\text{C}$ . Inoculation of the fermentor was done at  $2 \pm 0.5 \cdot 10^5$  CFU  $\text{ml}^{-1}$ .

### Fermentation conditions

Cultures were conducted in a 5-l fermentor (Biostat® Aplus, Sartorius-Stedim, Aubagne, France) with a 1.5-l working volume. Environmental conditions were chosen as  $37^{\circ}\text{C}$  (temperature of the mouth) and pH 6.7 (mean value of human saliva pH). The pH was controlled by the automatic addition of 2 mol  $\text{l}^{-1}$  KOH and 1% (w/w)  $\text{H}_2\text{SO}_4$  solutions in the bioreactor.

The KOH consumption in the bioreactor was measured using Sartorius software MSCF/DA. An agitation speed of 80 rpm was applied to perform medium homogenization. Continuous injection of 0.1 vvm of a gas composed of 79% nitrogen, 15% oxygen and 5% carbon dioxide (Air Liquide, Paris, France) was achieved in order to simulate breathed-out air.

The culture medium corresponded to an artificial saliva medium (40) that was composed of: 0.90 g  $\text{l}^{-1}$  KCl; 0.66 g  $\text{l}^{-1}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0.08 g  $\text{l}^{-1}$   $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0.49 g  $\text{l}^{-1}$   $\text{KHCO}_3$ ; 0.37 g  $\text{l}^{-1}$   $\text{NaNO}_3$ ; 0.12 g  $\text{l}^{-1}$   $\text{CaCO}_3$ ; 0.60 g  $\text{l}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 0.10 g  $\text{l}^{-1}$  KSCN; 0.20 g  $\text{l}^{-1}$  urea; 700 U  $\text{mL}^{-1}$  lysozyme (Sigma-Aldrich, Lyon, France), 0.8 mU  $\text{mL}^{-1}$  peroxidase (Sigma-Aldrich), and 2.00 g  $\text{l}^{-1}$  porcine stomach type III mucin (Sigma-Aldrich). Ionic, urea and enzymes levels were similar to those found in human saliva (15). Mucin concentration corresponded to whole salivary proteins content. The medium was sterilized in the fermentor at  $121^{\circ}\text{C}$  for 20 min before use.

A representative "meal" composed of 5 g  $\text{l}^{-1}$  glucose (Merck, Darmstadt, Germany) and 1.4 g  $\text{l}^{-1}$  meat extract (Biokar Diagnostics) was brought two times a day at 1  $\text{ml min}^{-1}$  during 30 min. Nutrient flow was monitored by a peristaltic pump linked to a programmable timer.

After 4 h-batch culture to enable bacterial growth, continuous culture was established for 92 hours. Culture medium volume was maintained at a constant value by using a level probe. The culture vessel was supplied by artificial saliva medium at different flow rates to simulate circadian cycles (Fig. 1). Unstimulated saliva flow rate was mimicked by a dilution rate of 0.1  $\text{h}^{-1}$  between meals, whereas a dilution rate of 0.75  $\text{h}^{-1}$  allowed imitating stimulated saliva flow rate during meals. As the human saliva flow is insignificant during the night, dilution rate was set as 0  $\text{h}^{-1}$  in the experiment. During the first day, a batch culture occurred from inoculation to 4 h (and meal introduction), followed by 1.5 h of unstimulated flow (0.1  $\text{h}^{-1}$ ) and 1 h of stimulated flow (0.75  $\text{h}^{-1}$ ) before coming back to unstimulated flow from 6.5 h to 14 h culture. Flow was then decreased to 0  $\text{h}^{-1}$  for 10 h until the next day. During days 2, 3 and 4, continuous cultures were organized according to five phases. Each day started with 1 h stimulated flow (0.75  $\text{h}^{-1}$ ), and during the first 30 min, a meal was delivered at 1  $\text{ml min}^{-1}$ . Stimulated saliva flow was then replaced by unstimulated saliva flow (0.1  $\text{h}^{-1}$ ) for 4.5h. Then, a second meal was supplied for 30 min and stimulated flow was applied during 1 h again. During afternoon, unstimulated flow was introduced during 6.5 h and then, a long stationary phase was set during the night, with a dilution rate equal to 0 during 10 h, until the next day. Fermentations were repeated five times and the reproducibility was assessed by considering the kinetics of growth (CFU  $\text{ml}^{-1}$ ) and of KOH consumption (g  $\text{l}^{-1}$ ).

### Carbohydrates and lactic acid measurements

Glucose and lactic acid concentrations were quantified using High Performance Liquid Chromatography (HPLC, Waters Associates, Millipore, Molsheim, France), after precipitation with 120 g  $\text{l}^{-1}$  trichloroacetic acid, as described by Rault et al. (37).

### Measurement of cultivability, viability, mortality and intracellular pH

Cultivability was evaluated by plate counts. Cells were plated onto M17 agar (Biokar Diagnostics) and incubated at 37°C for 24 h under anaerobic conditions (Genbox 96124, bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). Each result was the geometrical mean of at least three counts.

Dual staining using carboxyfluorescein diacetate (cFDA) and propidium iodide (PI) made it possible to differentiate viable, dead and damaged cells of *S. salivarius* K12 (35). The nucleic acid dye PI allowed quantifying the cells with damaged membranes, whereas cFDA was used to assess the level of esterase activity. Cell suspensions were diluted in Mac Ilvaine buffer, pH 7.3 (0.2 mol l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.01 mol l<sup>-1</sup> citric acid) to reach 1·10<sup>6</sup> cells ml<sup>-1</sup>. One mL of the diluted suspension was supplemented with 5 µL PI (1.496 mmol l<sup>-1</sup> in distilled water, Sigma-Aldrich) and 10 µl of V8 commercial solution (cFDA Chemchrome V8, AES Chemunex Inc, Ivry-sur-Seine, France) diluted ten times in acetone. After incubation for 15 min at 40°C, analysis was performed by flow cytometry on a CyFlow® space cytometer (Partec GmbH, Münster, Germany). Numbers (in cells ml<sup>-1</sup>) and percentages of stained cells were determined with the aid of statistical tables given by FloMax® Software (Partec GmbH). Each result corresponded to the mean of at least six measurements.

The fluorochrome 5-(6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (cFDA-SE) was used for pH<sub>i</sub> measurements. A calibration curve was established beforehand by plotting the logarithm of the mean fluorescence intensity as a function of the pH of equilibrated cells, in the range of pH 5.5 to pH 7.0 (36). After staining with cFDA-SE (Invitrogen, Eragny-sur-Oise, France) for 10 min at 40°C, 100 µl of cell suspension were diluted in 1 ml of Mac Ilvaine buffer, pH 6.7, to obtain 1·10<sup>6</sup> cells ml<sup>-1</sup>. The fluorescence intensity was measured by flow cytometry and the linear calibration curve made it possible to quantify the intracellular pH.

### RNA extraction and quantitative real-time reverse transcription-PCR (qRT-PCR).

One volume of ice-cold K-Buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 20 mM Na<sub>3</sub>N) was immediately added to two volumes of each culture sample and gently mixed. Pellets were collected by centrifugation (8,000 *g*, 3 min; 4°C) and rapidly frozen in liquid nitrogen before to be stored at -80°C. Frozen pellets were resuspended in solution containing TE (500 µl; 1M) and phenol-chloroform (500 µl; 5/1; Sigma) and transferred in tubes containing 500 mg of zirconium beads (0.1 mm; Biospec) and Na-acetate (50 µl; pH 4.8; 3 M). Cells were broken in a Savant FastPrep FP120 apparatus (30 seconds at 4.5; Qbiogene, France), and the mixtures were centrifuged to remove beads and cellular solid fractions (13,000 rpm; 15 min; 4°C). Total RNA from the upper liquid phase was extracted using a classical phenol-chloroform extraction method (20). Eventual residual chromosomal DNA was removed by treating total RNA preparations with RNase-free DNase I (Roche) according to the manufacturer's protocol. Finally, to obtain very pure RNA containing low amounts of small stable RNA molecules (tRNAs and 5S rRNA), additional purification steps were carried out, as instructed by the manufacturer, using the RNA-cleanup and concentration Micro kit (Norgen, Canada). The concentration of RNA was measured with a Nanodrop 1000 spectrophotometer (Peqlab, Germany). Traces of genomic DNA contamination was checked by using RNA directly as a template for PCR. The integrity and quality of RNA were assessed both by electrophoresis on a denaturing formaldehyde agarose gel and with a Bioanalyzer (Agilent, Germany).

Quantitative real-time reverse transcription-PCR (qRT-PCR) was carried out using first-strand cDNA as the template. The primers used are listed in Table 1. Synthesis of cDNAs and quantitative PCR were carried out as described previously (42). Melting curves were performed after completion of each experiment. The expression of *rrf* was constant under all tested conditions in the microarray results, and thus this gene was chosen as a reference gene for quantification. Relative fold change in gene expression was calculated by 2<sup>-(ΔΔCT)</sup> method. For each gene, qRT-PCR experiments were performed in triplicate and statistical significance between the mean ratios of genes was evaluated by Student's *t* test in using *rrf* as reference gene. A *P* value of <0.05 was considered significant.

### Microarray analysis and Real-Time Quantitative RT-PCR.

A customized whole-genome microarray containing all open reading frames (ORFs) of *Streptococcus salivarius* K12 was used in this study. For microarray design, the eArray platform by Agilent was utilized (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Microarray contains at least three probes (60 bp in length) for each ORF and positive and negative controls from Agilent.

RNA samples were labeled with either Cy3 or Cy5 fluorescent dye (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom) by using a SuperScript Direct cDNA labeling system kit (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. Hybridizations were performed for 16 h at 64°C in dedicated Agilent hybridization chamber with 200-pmol portions of the different samples. The arrays were scanned using the Agilent DNA microarray scanner, and the raw data were extracted using Agilent Feature Extraction software. The complete experimental data set was deposited in the GEO database. The analyses were performed twice by swapping the fluorescent dyes, Cy3 and Cy5, to reduce the dye bias and the technical variance and each experiment was performed in two biological replicates and two technical replicates. Raw data comprised the logarithm of median feature pixel intensity at wavelengths of 635 nm and 532 nm without background subtraction. Spots that were considered to be badly formed features were excluded from the analysis. An array-by-array normalization was performed to remove systematic biases in performing a global intensity-dependent normalization with the Loess procedure to correct the dye bias of the two channels of one array (51). To determine differentially expressed genes, we performed a paired *t* test on the log ratios implemented in the Anapuce R package (Tools for Microarray Data Analysis 2010, R package [<http://www.R-project.org>]; J. Aubert [INRA], Anapuce). The variance was divided between subgroups of genes with homogeneous variance (14). Statistical raw *P* values were adjusted for multiple comparisons by using the Benjamini-Hochberg procedure (2), which controls the false discovery rate after estimation of the proportion of differentially expressed genes by using the smoother method (43). Probes with a fold change of >2.0 and a *P* value of <0.05 were selected for gene expression pattern discovery. In addition, genes for which at least two probes were identified as differentially expressed were considered as significantly differentially expressed. Finally, selected genes were categorized into functional groups according to functional categories of clusters of orthologous groups with COGNITOR software (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/old/xognitor.html>) followed by a manual inspection.

## Results

*Streptococcus salivarius* K12 was grown in a chemostat at pH 6.7 and 37°C, in artificial saliva medium. Variable dilution rates, between 0 and 0.75 h<sup>-1</sup>, allowed mimicking the dynamic conditions prevailing in human oral cavity. Growth kinetic was determined from KOH consumption, cultivability and flow cytometry measurements.

### Acidification kinetics

Variation of KOH consumption during 4-days continuous cultures of *S. salivarius* K12 is shown on Fig. 1. During the nights, KOH consumption stopped during 16 h, which was considered as a stationary phase. Except for the consumption of 6 g l<sup>-1</sup> of KOH during day 1 (initial batch culture), a constant level of 4.5 ± 0.2 g l<sup>-1</sup> (e.g. 2.2 ± 0.1 g l<sup>-1</sup> during each nutrient delivery) was consumed during each day, from day 2 to day 4. The difference was explained by the complete use of the nutrients during the batch, while during continuous culture, some wash out of the nutrients occurred, thus reducing their availability. The KOH consumption rate was similar after each meal (1.23 ± 0.2 g l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), except for the second meal on day 1, which was a consequence of the previous batch phase. Lag time was always equal to zero, thus indicating that the bacteria were able to restart growth rapidly after stationary phase.



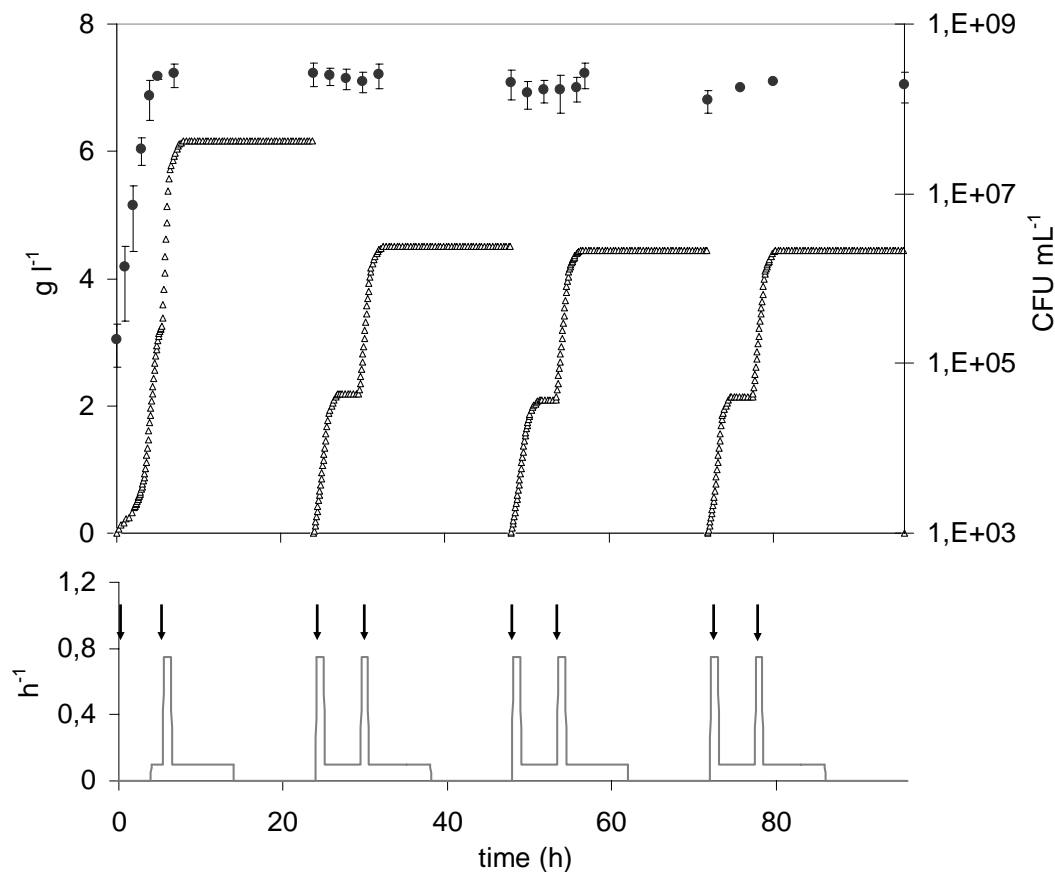


Figure 1: KOH consumption ( $\Delta$ ) and cultivability ( $\bullet$ ) and dilution rate ( $-$ ) during 4-days continuous culture of *S. salivarius* K12 in artificial saliva medium complemented with nutrient introduction ( $\downarrow$ )

These results were confirmed by considering glucose and lactic acid concentrations. At the end of the batch culture, a residual glucose concentration of 0 g l<sup>-1</sup> was measured together with a lactic acid concentration of 3.2 ± 0.5 g l<sup>-1</sup>. During days 2, 3 and 4, glucose concentration remained at 0 g l<sup>-1</sup>, except at the end of the nutrient delivery, where it temporary increased to 0.5 ± 0.1 g l<sup>-1</sup> before dropping until zero. When cells entered KOH consumption stationary phase, glucose concentration was always equal to zero, thus leading to starvation conditions. During the continuous cultures (days 2 to 4), lactic acid concentration increased until 2.1 ± 0.2 g l<sup>-1</sup> after meal introduction and decreased until 1.4 ± 0.2 g l<sup>-1</sup> after stationary phase.

### Cultivability and viability

In order to characterize growth and maintenance of *S. salivarius* K12 cells during continuous cultures, cultivability (Fig.1), viability and mortality (Fig. 2) were assessed. During the batch phase, CFU concentration reached 1.4 ± 0.7·10<sup>8</sup> CFU ml<sup>-1</sup>, and the growth rate was equal to 1.7 h<sup>-1</sup>. When continuous feeding and removal of artificial saliva was set up, CFU concentration stabilized at 3.0 ± 0.7·10<sup>8</sup> CFU ml<sup>-1</sup> (Fig. 1). During stationary phase, CFU concentration slightly decreased (but not significantly) from 2.4 ± 0.3·10<sup>8</sup> CFU ml<sup>-1</sup> to 1.8 ± 0.4·10<sup>8</sup> CFU ml<sup>-1</sup>. Nevertheless, it recovered initial concentration after each nutrient delivery and was maintained constant during the day, indicating that growth rate of *S. salivarius* K12 was equal to the dilution rate used during and after each supply (0.75h<sup>-1</sup>).

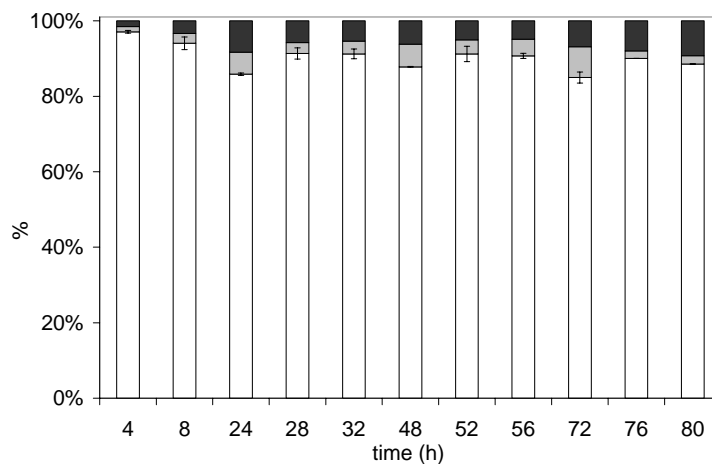


Figure 2: Relative percentages of viable ( $\square$ , in %), damaged ( $\blacksquare$ , in %), and dead ( $\blacksquare$ , in %) cells measured during continuous culture of *S. salivarius* K12

From Fig. 2, viable cells dominated in the bacterial suspension. There were more than 86% of viable cells, and at most 9% of dead cells, whatever the considered culture time. Viability was higher in samples collected during the batch culture ( $97 \pm 0.3\%$  after 4 h) than during continuous cultures where it varied between 86% and 91%. At the end of the 16 hours-stationary phases that mimicked the night, the proportion of viable cells decreased from  $90 \pm 1.2\%$  to  $86 \pm 1.1\%$ . After further addition of nutrients, cellular viability increased again and reached the initial level of  $91 \pm 0.9\%$ . From these results, *S. salivarius* K12 cells were able to maintain a good physiological state during the 16-hours stationary phases (starvation conditions) and to restart their growth rapidly after nutrient delivery. Finally, the intracellular pH was stable throughout the continuous culture, at  $\text{pH } 6.67 \pm 0.1$ , which corresponded to the pH of culture medium ( $\text{pH } 6.7$ ). Therefore, the pH gradient between intracellular and extracellular media was equal to zero.

### Transcriptomic analysis of starvation adaptation

In order to better understand the quick restart of growth of *S. salivarius* K12 after nutrient introduction, DNA microarray analysis was performed. Three samples were recovered at 52.5 h (A), 57.5 h (B) and 72 h (C) of the continuous cultures. The first two samples (A and B) were collected 1.5 h after the end of KOH consumption that followed the two nutrient deliveries. These cells were not starved as they entered stationary phase, as confirmed by glucose concentration that just reached  $0 \text{ g l}^{-1}$ . Sample C was picked up at the end of the 16 hours-stationary phase, just before the nutrient delivery. Consequently, these cells had suffered 14.5 h starvation. Comparison of samples A and B will allow us comparing transcriptomic data of cells entering stationary phase. Comparison of samples B and C will help us understanding how *S. salivarius* K12 adapted itself to starvation.

Analysis of *S. salivarius* K12 transcriptome revealed that 422 genes were identified as different, according to the three conditions. By comparing the transcriptome of samples A and B, only 26 genes were differentially expressed. Moreover, the corresponding genes fold changes were low, as they were comprised between 0.28 and 0.42 for the genes under-expressed in sample A, or between 2.14 and 4.65 for the over-expressed genes. These results confirmed those obtained from kinetic and physiological measurements, which indicated that no significant difference was observed between A and B samples. It also allowed us validating the biological significance of transcriptomic results.

Significant changes in cells gene expression were observed by considering samples B (57.5 h) and C (72 h). Fig. 3 presents a DNA microarray analysis, which displays the number of under- or over-expressed

genes, grouped according to their functional classes (Table 3 and Table 4 including complete data, with all genes differentially expressed are supplied as supplementary material).

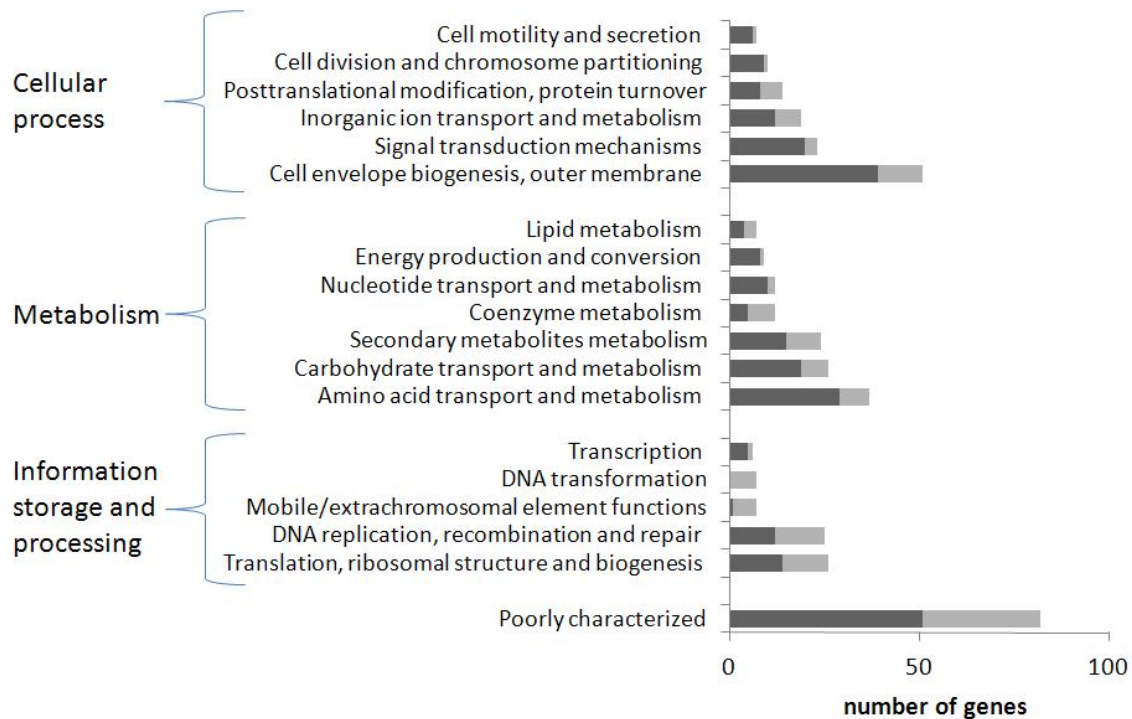


Figure 3: Number of genes over-expressed at early stationary phase (B) (■) and late stationary phase (C) (■) during continuous culture of *S. salivarius* K12in artificial saliva

Statistical analysis of the transcriptomic data revealed that 407 genes varied at least twofold between B and C samples. B sample displayed 140 down-regulated and 267 up-regulated genes, as compared to C samples. For 15 of these genes, which were representative of the various expression patterns observed in DNA microarray, specific RT-qPCR measurements was performed in order to validate DNA microarray results. The modification of expression was confirmed for 12 of them (Table 3 and Table 4 in the supplementary material).

The 407 genes that were over- or down-expressed belonged to 19 functional classes, as shown in Fig. 3. For 11 functional classes, proportion of up-regulated genes was higher (upper 60%) in B samples than in C samples that suffered 14.5 h glucose starvation. These genes were involved in cell division (9 over-expressed genes / 1 under-expressed gene), energy production (8/1), motility (6/1), ion transport and metabolism (12/7), carbohydrate transport and metabolism (19/7), amino acid metabolism (29/8), nucleotide metabolism (10/2), cell envelop biogenesis including peptidoglycan and polysaccharides metabolism (39/12), transcription (5/1) and in some regulatory functions (signal transduction) (20/3). Genes showing uncharacterized functions (51/31) were also up-regulated in B sample. Most of the genes over-expressed in C sample were related to DNA transformation (7 over-expressed genes) and to mobile and extra-chromosomal elements (6/1).

Finally, genes involved in functional classes including DNA metabolism (12 over-expressed genes in B sample / 13 under-expressed genes), translation, ribosomal structure and biogenesis (14/12), post-translational modification, protein turnover and chaperones (8/6), lipid (4/3) and coenzyme (5/7) metabolism, as well as secondary metabolites metabolism (15/9) were either over- or under-expressed in B and C samples. Into DNA metabolism class function, gene encoding for DNA polymerase subunit were up-regulated in B sample whereas those encoding for DNA repair were over-expressed in C samples.

## Discussion

Continuous cultures of *S. salivarius* K12 in saliva medium displayed highly stable behavior, either during nutrient delivery or starvation conditions. As a first observation, the CFU concentration was maintained at a constant level all along the culture, thus indicating that no wash-out occurred, despite a 0.75 h<sup>-1</sup> dilution rate. A specific growth rate of 1.8 h<sup>-1</sup> was measured in batch culture, whereas in continuous culture, it was equal to the dilution rate (0.75 h<sup>-1</sup>). The specific growth rate during batch culture was high, in agreement with that obtained by Chassy et al. (10), who achieved a generation time of 21 min. The generation time (25 min) during batch period was lower than that obtained by Roger et al. (40) (15 min). This difference was explained by the presence of enzymes and gas injection in saliva medium, which were shown to negatively affect the specific growth rate of *S. salivarius* K12, mainly because of higher redox potential (41). In the oral cavity, this high specific growth rate probably enabled this strain to predominate over the other bacteria and to maintain itself in spite of the mouth wash-out, as previously suggested by Roger et al. (40).

In addition to the rapid growth of *S. salivarius* K12, the maintenance of a constant cell concentration was observed during the 16 h-stationary phases of KOH consumption in continuous culture. As this stationary phase was characterized by a lack of carbohydrates, it was considered as a starvation period. Consequently, our results suggest that *S. salivarius* K12 well adapted itself to a short term starvation period. This behavior is in agreement with that observed by Roger et al. (40) who demonstrated that CFU concentration of the same strain remained constant during 25 h stationary phase in batch culture, i.e. without wash-out of the saliva medium. Chavez de Paz et al. (11) found a slight decrease of optical density from 0.8 to 0.71 for *Streptococcus anginosus*, and from 0.5 to 0.46 for *Lactobacillus salivarius* after 24 h starvation. By considering the oral bacterium *S. mutans*, Renye et al. (39) showed a decrease of cultivability only after two days starvation. The stability of *S. salivarius* K12 during 14.5 h starvation is strengthened by the very slight decrease of viable cells proportion, which varied from 90 to 86 % during stationary phase. This result is in agreement with that of Chavez de Paz et al. (11) who reported a slight decrease (from 91 to 84 %) of *S. anginosus* cells showing undamaged membrane during 24 h starvation. The presence of mucin into the culture medium could promote this bacterial maintenance during stationary phase. Renye et al. (39) and Busuioc et al. (8) have shown that mucin significantly prolonged survival of sugar-starved biofilms and batch cultures of *S. mutans* and helped cells to withstand starvation.

In order to understand how *S. salivarius* K12 adapted itself to short term starvation, comparative transcriptomic analysis of sample B, collected when glucose just exhausted, and sample C that was recovered after 14.5 h glucose starvation, was carried out. Four main responses were found to explain *S. salivarius* K12 behavior.

The first response of *S. salivarius* K12 to glucose deficiency was the establishment of a transitory state, which helped the cells to better survive further starvation. In sample B, many genes from cell division, transcription, translation, peptidoglycan synthesis, nucleotides and amino acids metabolism and energy metabolism were up-regulated. These results indicated that, at the beginning of stationary phase, genes involved in general processes associated with cell growth were still expressed, possibly because cells just ended growth phase. Redon et al. (38) also demonstrated that expression of genes related to cell growth (transcription, translation) decreased during starvation. 20 genes from the 23 that were related to regulatory functions, and many genes encoding for alternative carbon sources, such as pullulanase, mannose, maltodextrin and ribose/galactose transporters were also over-expressed in sample B. These results were in agreement with another study which demonstrated in *L. lactis*, that genes coding for transport, utilization and regulation pathways of alternative carbon sources were promoted during deceleration phase and after glucose exhaustion (38). Such induction of metabolism of alternative carbon sources was also observed in *B. subtilis* during carbon starvation (3). The over-expression of the gene

yxjE, responsible for the synthesis of the universal stress protein UspA was observed in sample B. In *E. coli*, the corresponding gene *uspA* was shown to be over-expressed when the cells were inhibited by a lack of various nutrients (31), and in *Salmonella* sp. when the cells entered stationary phase (26). From these results, it can be concluded that when glucose was used up, *S. salivarius* K12 entered in a transitory state, moving from growth phase that was revealed by residual cell growth processes, to maintenance phase, that was demonstrated by the setting up and regulation of pathways dedicated to other energy sources than glucose.

The second response of *S. salivarius* K12 to glucose exhaustion concerned energy storage, which helped the cells to better tolerate starvation. The induction of seven genes that are responsible for homopolysaccharides synthesis was observed in sample B. They encoded for glucan synthesis (glucosyltransferases and precursors). As glucosyltransferases genes were expressed in a medium without sucrose, expression of homopolysaccharide genes in *S. salivarius* K12 was constitutive. This hypothesis was supported by the work of Townsend-Lawman and Bleiweis (47) who demonstrated the existence of a glucosyltransferase activity in *S. salivarius* grown on sucrose, glucose or galactose. It was also in agreement with the results of Wenham et al. (48), who concluded that glucosyltransferase and fructosyltransferase are constitutive enzymes in *S. mutans*. Genes coding for molecules involved in energy storage, such as glycogen (*glgP*, *malQ*), were over-expressed in B samples. Glycogen is a major intracellular reserve polymer that is stored by bacteria under limiting growth conditions. It is used by the cells to cope with starvation conditions and to provide energy for maintenance upon nutrient depletion, notably for the oral bacterium *S. mutans* (8, 50). Moreover, absence of glycogen synthase during carbon starvation in *S. mutans* led to a decrease of cultivability (8). Consequently, cells stored energy when entering the starvation period, in order to maintain themselves until further nutrient reintroduction. In *S. salivarius* K12, this was achieved by the formation of glycogen and homopolysaccharides that constituted energetic storage molecules (29, 50).

The third response of *S. salivarius* K12 to carbon loss is related to biofilm formation and to adhesion. Indeed, when cells encountered unfavorable environmental conditions, they tended to develop biofilms that help them to become more resistant to several stress (24). From transcriptomic analysis, seven genes from the *eps* operon, responsible for exopolysaccharide formation, were over-expressed in sample B that was recovered when cells entered into glucose starvation. Moreover, six genes linked to cellular adhesion were also induced. Loo et al. (27) and Heilmann et al. (22) demonstrated that some genes required for biofilm formation belong to *eps* operon or to cellular adhesion, respectively. From this information, it may be proposed that *S. salivarius* cells, when they just ended growth phase, tended to form biofilms, thus rendering them more resistant to starvation.

The last answer of *S. salivarius* K12 to glucose exhaustion concerned its ability to rapidly recover growth. When glucose was brought to the medium after 14.5 h starvation, no lag time was observed for KOH consumption, and the proportion of viable cells increased rapidly. These results are in agreement with those obtained by Chavez de Paz et al. (11) who observed that *S. anginosus* and *L. salivarius* recovered their metabolic activity and restarted their growth 2 h after starvation ended. This behavior can be linked to the transcriptomic results obtained in C sample that was collected after 14.5 h of starvation. 139 genes (34%) were up-regulated after starvation, as compared to the beginning of starvation. They included six genes belonging to competence, as well as 11 genes involved in DNA repair, which can be related to competence phenomenon. This result is in agreement with those of Redon et al. (38) and Jarmer et al. (23) who detected an induction of competence during carbon starvation in *L. lactis* and during nitrogen starvation in *B. subtilis*, respectively. In addition, Giliberti et al. (19) demonstrated, that the gene *recA*, implicated in competence, was induced during carbon starvation in *S. thermophilus*. From these results, it can be suggested that during starvation, cells adapted themselves to environmental stress conditions by increasing competence, which partly explained the quick recovery of growth after nutrient supply. Moreover, DNA can serve as a source of carbon and energy for bacteria during nutrient exhaustion and natural genetic competence could act for degrading DNA, as demonstrated for *E. coli* (16, 32).

From Chavez de Paz et al. (11), this reactivation differed depending on the culture medium. These authors showed that 29% of *L. salivarius* cells recovered their esterase activity in a rich medium, instead of 7% in less rich medium. This observation underlined the necessity of working with a culture medium close to human saliva.

From this information, it can be concluded that the oral bacterium *S. salivarius* K12 is well adapted to dynamic mouth-like conditions, as demonstrated by the maintenance of cultivability and viability during stationary phase and by its ability to rapidly recover growth after nutrients supply. These observations have been explained at a transcriptomic level by the existence of metabolic switch and adaptation to starvation conditions at the beginning of sugar exhaustion, and by induction of competence after 14.5 h starvation. In the future, the use of a real saliva medium, together with a more complex alternation of meals, will help us to better simulate the real oral conditions in order to confirm these interpretations. Moreover, the combination of *S. salivarius* with other microorganisms generally present in the mouth should be studied, as microbial interaction phenomena may occur and modify the behavior of the bacteria.

## Acknowledgment

The authors wish to thank Dr. Jeremy Burton (BLIS Technologies Ltd, Dunedin, New Zealand) for providing the strain *S. salivarius* K12, Dr. Bernard Berger (Nestlé Research Center, Lausanne, Switzerland) for giving us access to *S. salivarius* K12 genome, and Dr. Pierre Renault (INRA, Jouy-en-Josas, France) for very helpful scientific discussions.

## References

1. Aas, J. A., B. J. Paster, L. N. Stokes, I. Olsen, and F. E. Dewhirst. 2005. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *Journal of clinical microbiology* 43:5721-5732.
2. Benjamini, Y., and Y. Hochberg. 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society* 57:289-300.
3. Bernhardt, J., J. Weibezahn, C. Scharf, and M. Hecker. 2003. *Bacillus subtilis* during feast and famine: visualization of the overall regulation of protein synthesis during glucose starvation by proteome analysis. *Genome Research* 13:224-237.
4. Bradshaw, D. J., P. D. Marsh, C. Allison, and K. M. Schilling. 1996. Effect of oxygen, inoculum composition and flow rate on development of mixed-culture oral Biofilms. *Microbiology* 142:623-629.
5. Bradshaw, D. J., P. D. Marsh, R. J. Hodgson, and J. M. Visser. 2002. Effects of glucose and fluoride on competition and metabolism within *in vitro* dental bacterial communities and biofilms. *Caries Research* 36:81-86.
6. Bradshaw, D. J., A. S. McKee, and P. D. Marsh. 1989. Effects of carbohydrate pulses and pH on population shifts within oral microbial communities *in vitro*. *Journal of Dental Research* 68:1298-1302.
7. Burton, J. P., C. N. Chilcott, C. J. Moore, G. Speiser, and J. R. Tagg. 2006. A preliminary study of the effect of probiotic *Streptococcus salivarius* K12 on oral malodour parameters. *Journal of Applied Microbiology* 100:754-64.
8. Busuioc, M., K. Mackiewicz, B. A. Buttaro, and P. J. Piggot. 2009. Role of intracellular polysaccharide in persistence of *Streptococcus mutans*. *Journal of bacteriology* 191:7315-7322.
9. Carlsson, J. 1984. Regulation of sugar metabolism in relation to feast-and famine existence of plaque. *In* B. Guggenheim (ed.), *Cariology today*. Karger, S, Bâle, Suisse.

10. Chassy, B. M., J. R. Beall, R. M. Bielawski, E. V. Porter, and J. A. Donkersloot. 1976. Occurrence and distribution of sucrose-metabolizing enzymes in oral streptococci. *Infection and Immunity* 14:408-415.
11. Chavez de Paz, L. E., I. R. Hamilton, and G. Svensater. 2008. Oral bacteria in biofilms exhibit slow reactivation from nutrient deprivation. *Microbiology* 154:1927-1938.
12. De Jong, M. H., J. S. van der Hoeven, J. H. van Os, and J. H. Olijve. 1984. Growth of oral *Streptococcus* species and *Actinomyces viscosus* in human saliva. *Applied and environmental microbiology* 47:901-904.
13. Del Vigna de Almeida, P., A. M. Gregio, M. A. Machado, A. A. de Lima, and L. R. Azevedo. 2008. Saliva composition and functions: a comprehensive review. *The journal of contemporary dental practice* 9:72-80.
14. Delmar, P., S. Robin, and J. J. Daudin. 2005. VarMixt: efficient variance modelling for the differential analysis of replicated gene expression data. *Bioinformatics* 21:502-508.
15. Edgar, W. M. 1990. Saliva and dental health. Clinical implications of saliva: report of a consensus meeting. *British dental journal* 169:96-8.
16. Finkel, S. E., and R. Kolter. 2001. DNA as a nutrient: novel role for bacterial competence gene homologs. *Journal of bacteriology* 183:6288-6293.
17. Giard, J. C., A. Hartke, S. Flahaut, P. Boutibonnes, and Y. Auffray. 1997. Glucose starvation response in *Enterococcus faecalis* JH2-2: survival and protein analysis. *Research in Microbiology* 148:27-35.
18. Gibbons, R. J., B. Kapsimalis, and S. S. Socransky. 1964. The source of salivary bacteria. *Archives of Oral Biology* 9:101-103.
19. Giliberti, G., G. Naclerio, L. Martirani, E. Ricca, and M. De Felice. 2002. Alteration of cell morphology and viability in a recA mutant of *Streptococcus thermophilus* upon induction of heat shock and nutrient starvation. *Gene* 295:1-6.
20. Glatron, M. F., and G. Rapoport. 1972. Biosynthesis of the parasporal inclusion of *Bacillus thuringiensis*: half-life of its corresponding messenger RNA. *Biochimie* 54:1291-1301.
21. Guglielmetti, S., V. Taverniti, M. Minuzzo, S. Arioli, M. Stuknyte, M. Karp, and D. Mora. 2010. Oral bacteria as potential probiotic for the pharyngeal mucosa. *Applied and environmental microbiology* 76:3948-3958.
22. Heilmann, C. 2003. Molecular basis of biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. In M. Wilson and D. Devine (ed.), *Medical implications of biofilms*, vol. 1. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
23. Jarmer, H., R. Berka, S. Knudsen, and H. H. Saxild. 2002. Transcriptome analysis documents induced competence of *Bacillus subtilis* during nitrogen limiting conditions. *FEMS Microbiology Letters* 206:197-200.
24. Jefferson, K. K. 2004. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters* 236:163-173.
25. Len, A. C. L., S. J. Cordwell, D. W. S. Harty, and N. A. Jacques. 2003. Cellular and extracellular proteome analysis of *Streptococcus mutans* grown in a chemostat. *PROTEOMICS* 3:627-646.
26. Liu, W. T., M. H. Karavolos, D. M. Bulmer, A. Allaoui, R. D. C. E. Hormaeche, J. J. Lee, and C. M. Anjam Khan. 2007. Role of the universal stress protein UspA of *Salmonella* in growth arrest, stress and virulence. *Microbial Pathogenesis* 42:2-10.
27. Loo, C. Y. 2003. Oral streptococcal genes that encode biofilm formation p. 212-227. In M. Wilson and D. Devine (ed.), *Medical implications of biofilms*, vol. 1. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
28. Mandel, I. D. 1987. The functions of saliva. *Journal of Dental Research* 66:spec No: 623-627.
29. Marsh, P. D., and M. V. Martin. 2009. *Oral Microbiology*, vol. fifth Edition. Elsevier, London, UK.

30. McBain, A. J., R. G. Bartolo, C. E. Catrenich, D. Charbonneau, R. G. Ledder, and P. Gilbert. 2003. Effects of triclosan-containing rinse on the dynamics and antimicrobial susceptibility of *in vitro* plaque ecosystems. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 47:3531-3538.
31. Nyström, T., and F. C. Neidhardt. 1992. Cloning, mapping and nucleotide sequencing of a gene encoding a universal stress protein in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 6:3187-3198.
32. Palchevskiy, V., and S. E. Finkel. 2006. *Escherichia coli* competence gene homologs are essential for competitive fitness and the use of DNA as a nutrient. *Journal of bacteriology* 188:3902-3910.
33. Parret, J., G. Bobillon, and M. Lissac. 1982. Milieu buccal : Stomatologie, p. 22008 A10, Encyclopédie Médico Chirurgicale, Paris, France.
34. Pratten, J., M. Pasu, G. Jackson, A. Flanagan, and M. Wilson. 2003. Modelling oral malodour in a longitudinal study. *Archives of Oral Biology* 48:737-743.
35. Rault, A., C. Béal, S. Ghorbal, J. C. Ogier, and M. Bouix. 2007. Multiparametric flow cytometry allows rapid assessment and comparison of lactic acid bacteria viability after freezing and during frozen storage. *Cryobiology* 55:35-43.
36. Rault, A., M. Bouix, and C. Béal. 2008. Dynamic analysis of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1 physiological characteristics during fermentation. *Applied microbiology and biotechnology* 81:559-70.
37. Rault, A., M. Bouix, and C. Béal. 2009. Fermentation pH influences the physiological-state dynamics of *Lactobacillus bulgaricus* CFL1 during pH-controlled culture. *Applied and environmental microbiology* 75:4374-4381.
38. Redon, E., P. Loubiere, and M. Coccagn-Bousquet. 2005. Transcriptome analysis of the progressive adaptation of *Lactococcus lactis* to carbon starvation. *Journal of bacteriology* 187:3589-3592.
39. Renye, J. A. J., P. J. Piggot, L. Daneo-Moore, and B. A. Buttaro. 2004. Persistence of *Streptococcus mutans* in stationary-phase batch cultures and biofilms. *Applied and environmental microbiology* 70:6181-6187.
40. Roger, P., J. Delettre, M. Bouix, and C. Béal. 2011. Characterization of *Streptococcus salivarius* growth and maintenance in artificial saliva. *Journal of Applied Microbiology* 111:631-641.
41. Roger, P., S. Harn-Arsa, J. Delettre, and C. Béal. 2011. Salivary enzymes and exhaled air affect *Streptococcus salivarius* growth and physiological state in complemented artificial saliva. *Archives of Microbiology*:1-6.
42. Sperandio, B., P. Polard, D. S. Ehrlich, P. Renault, and E. Guedon. 2005. Sulfur amino acid metabolism and its control in *Lactococcus lactis* IL1403. *Journal of bacteriology* 187:3762-3778.
43. Storey, J. D., and R. Tibshirani. 2003. Statistical significance for genomewide studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:9440-9445.
44. Sund-Levander, M., C. Forsberg, and L. K. Wahren. 2002. Normal oral, rectal, tympanic and axillary body temperature in adult men and women: a systematic literature review. *Scandinavian Journal of Caring Sciences* 16:122-128.
45. Tagg, J. R. 2004. Prevention of streptococcal pharyngitis by anti-*Streptococcus pyogenes* bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Streptococcus salivarius*. *The Indian journal of medical research* 119 13-16.
46. Tagg, J. R., C. N. Chilcott, and J. P. Burton. 2009. Treatment of malodour. United States patent US 7595041 B2.
47. Townsend-Lawman, P., and A. S. Bleiweis. 1991. Multilevel control of extracellular sucrose metabolism in *Streptococcus salivarius* by sucrose. *Journal of general microbiology* 137:5-13.
48. Wenham, D. G., T. D. Hennessey, and J. A. Cole. 1979. Regulation of glucosyl- and fructosyltransferase synthesis by continuous cultures of *Streptococcus mutans*. *Journal of General Microbiology* 114:117-124.
49. Wenzel, V., A. H. Idris, M. J. Banner, R. S. Fuerst, and K. J. Tucker. 1994. The composition of gas given by mouth-to-mouth ventilation during CPRt. *Chest* 106:1806-1810.



50. Wilson, W. A., P. J. Roach, M. Montero, E. Baroja-Fernández, F. J. Muñoz, G. Eydallin, A. M. Viale, and J. Pozueta-Romero. 2010. Regulation of glycogen metabolism in yeast and bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 34:952-985.
51. Yang, Y. H., S. Dudoit, P. Luu, D. M. Lin, V. Peng, J. Ngai, and T. P. Speed. 2002. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Research* 30:e15.

## Supplementary materials

Table 1: Characteristics of oligonucleotides used for RT-qPCR assessment.

Oligonucleotide number	Gene	Strain	Oligonucleotide sequence	Size	Size of the amplified fragment	T <sub>m</sub> (°C)	% GC
SSAL-Q53	<i>ureI</i>	K12	TGCCTTCACCTACCTTTACTCA	22	210	58.90	45
SSAL-Q54	<i>ureI</i>	K12	CCAGATGTTAAGCAAAGAATCC	22	314	57.89	40
SSAL-Q55	<i>fabH</i>	K12	GACCGTACAACAGCTGTCCTCT	22	448	60.74	54
SSAL-Q56	<i>fabH</i>	K12	GACTCAAGACCACCCTTGCTAC	22	548	60.17	54
SSAL-Q59	<i>comGB</i>	K12	ATGCTTCGTATGACCAAGGTTTC	22	127	60.38	45
SSAL-Q60	<i>comGB</i>	K12	ACCCTCTAACAGTTGCGGTAAA	22	234	60.06	45
SSAL-Q63	<i>aroE</i>	K12	CGATGCCATATAAGGAAGCAGT	22	200	60.48	45
SSAL-Q64	<i>aroE</i>	K12	ACCGTCCGTATTATGACCAATC	22	303	59.97	45
SSAL-Q69	<i>malQ</i>	K12	GAAACTTCGCAAGAAGACTTGCT	22	525	60.06	40
SSAL-Q70	<i>malQ</i>	K12	GTCACCGATGATTTGAATACCA	22	627	59.69	40
SSAL-Q71	<i>glgP</i>	K12	GTGTGGACTACGGTTTGATTGA	22	590	59.90	45
SSAL-Q72	<i>glgP</i>	K12	GGTAGATACGCAAGAGCTCACC	22	691	60.29	54
SSAL-Q73	<i>upp</i>	K12	ATCCCTCCAACCTGGTAAGAC	22	221	60.59	50
SSAL-Q74	<i>upp</i>	K12	AGCCTCCATCCAGTCATCTAAA	22	324	60.10	45
SSAL-Q79	<i>uvrB</i>	K12	GAAGTCGAGCACCTTGTTCTTT	22	739	59.93	45
SSAL-Q80	<i>uvrB</i>	K12	CTTACCCTCAGCTTCAAATTGC	22	846	60.26	45
SSAL-Q85	<i>dltB</i>	K12	GTTTGCCTAGCAGCATCTAAC	22	765	60.28	50
SSAL-Q86	<i>dltB</i>	K12	GGAACCAGAAAGACAAGCTCAT	22	868	59.76	45
SSAL-Q89	<i>citB</i>	K12	ATGATGGGCTCCTATATCCTGA	22	569	59.78	45
SSAL-Q90	<i>citB</i>	K12	TTCACCTAGCATAGCTGCTTCA	22	672	60.17	45
SSAL-Q93	<i>gtfD1</i>	K12	AACAACCTCAACCAGTTGCCTCT	22	132	60.21	45
SSAL-Q94	<i>gtfD1</i>	K12	GTATCAGCAGCCTTGTCAGTTG	22	239	59.94	50
SSAL-Q95	<i>gtfD2</i>	K12	AGGTCAAATGTACAAGGGTGGT	22	3648	59.66	45
SSAL-Q96	<i>gtfD2</i>	K12	GACCTTTAGCCATGACACCTTC	22	3748	60.00	50
SSAL-Q109	<i>rfaJ</i>	K12	AGTACACCGGGATTCAACATTC	22	782	60.12	45
SSAL-Q110	<i>rfaJ</i>	K12	TACCATAACAGGAGCAGCGATA	22	882	59.76	45
SSAL-Q113	<i>gbpD(bglB)</i>	K12	AGACGCAACAGTACAACCAGAA	22	1023	59.84	45
SSAL-Q114	<i>gbpD(bglB)</i>	K12	CTCTGTCCCAGGAAGATCAGTC	22	1128	60.25	54
SSAL-Q117	<i>oatA</i>	K12	ATCTCTGCCTGCTTTATGGTG	22	510	60.63	45
SSAL-Q118	<i>oatA</i>	K12	AAAGAGCGAGCCTAGGAAGAAT	22	615	60.01	45
SSAL-Q133	<i>rrf</i>	K12	TTGGTTATCCCAGCACTTACAG	22	298	59.15	45
SSAL-Q134	<i>rrf</i>	K12	TAGCTTCATCCATAGCATCACG	22	397	60.25	45

Table 2: Differentially expressed genes in sample A (52.5 h) compared to sample B (57.5 h).

Functional category	Locus tag	Assignment	Ratio
<b>Cellular processes</b>			
Cell envelope biogenesis, outer membrane	SalivC0941	Glycosyl transferase family 1	0.4
<b>Information storage and processing</b>			
Translation, ribosomal structure and biogenesis	SalivC0011	tRNA(Ile)-lysidine synthetase	2.3
	SalivC1851	tRNA-guanine transglycosylase	3.2
	SalivC2018	tRNA (5-methylaminomethyl-2-thiouridylate)-methyltransferase	3.6
<b>Metabolism</b>			
Amino acid transport and metabolism	SalivC0345	Cystathionine beta-lyase	0.4
	SalivC0538	Alanine dehydrogenase	2.3
	SalivC0937	S-adenosylmethionine synthetase	2.6
	SalivC1217	5,10-methylenetetrahydrofolate reductase	0.3
	SalivC1218	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-- homocysteine methyltransferase	0.3
Carbohydrate transport and metabolism	SalivC0446	Major facilitator:Oxalate:Formate Antiporter	4.6
	SalivC1049	Maltose/maltodextrin ABC transporter	1.9
Coenzyme metabolism	SalivC1689	Phosphopantetheine adenyltransferase	2.6
Nucleotide transport and metabolism	SalivC0330	Xanthine/uracil permease family protein	4.5
	SalivC1309	Xanthine permease, Nucleobase/Cation symporter-2 (NCS2) family protein	2.5
<b>Poorly characterized</b>			
General function prediction only	SalivC0328	Predicted metal-dependent hydrolase, cyclase family	0.4
	SalivC0468	Flavin reductase-like family	3.2
	SalivC1708	Uncharacterized conserved protein, CAAX protease	4.4
	SalivC1856	Cytochrome oxidase biogenesis (Oxa1) family protein	2.3
	SalivC1885	Predicted hydrolase of the HAD superfamily	2.1
	SalivC2017	Neutral amino acid transporter (NAAT) family protein	3.7
	SalivC2015	Phosphoesterase, DHH family protein	2.8
Unknown function	SalivC0010	Uncharacterized protein	2.9
	SalivC0938	Predicted membrane protein	0.4
	SalivC0939	Predicted membrane protein	0.4
	SalivC0940	Uncharacterized protein	0.4
	SalivC1936	Uncharacterized protein	3.8

Table 3: Genes up-regulated in sample B (57.5 h culture) compared to sample C (72 h culture)

Functional category	Locus tag	Assignment	Ratio (RT-qPCR)	Ratio ( $\mu$ -array)
<b>Cellular processes</b>				
Cell division and chromosome partitioning				
	435569	Cell division protein FtsQ		4.24
	448987	Cell division protein FtsX		4.60
	SalivC0807	Cell division protein FtsA		10.34
	SalivC0808	Cell division protein FtsZ		6.14
	SalivC0810	Cell division protein SepF		6.62
	SalivC0812	potential cell division protein. contains S4-like domain		5.02
	SalivC0813	Cell division initiation protein DivIVA		8.25
	SalivC1453	Cell division protein FtsY		3.70
	SalivC1727	Cell division protein FtsL		3.90
Cell envelope biogenesis, outer membrane				
	435559	Pneumococcal vaccine antigen A homolog		5.86
	449000	Glycosyl transferase family 1		5.41
	SalivC0140	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase		4.48
	SalivC0178	Predicted LPXTG cell wall surface protein		2.92
	SalivC0551	Glucosamine-1-phosphate N-acetyltransferase		3.11
	SalivC0557	Exopolysaccharide biosynthesis protein. Glycosyl transferase family 1		6.74
	SalivC0742	Prolipoprotein diacylglycerol transferase		4.31
	SalivC0761	Predicted cell wall surface protein. LysM domain protein undecaprenyldiphospho-muramoylpentapeptide beta-N-Acetylglucosaminyltransferase. Glycosyl transferase family 28		3.61
	SalivC0847	TDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase		8.39
	SalivC0875	Glucosyltransferase-S precursor (EC 2.4.1.5) (GTF-S) (Dextranucrase) (Sucrose 6-glucosyltransferase). Glycoside hydrolase family 70	6.25	4.61
	SalivC0876	Glucosyltransferase-SI precursor. Glycoside hydrolase family 70		8.10
	SalivC0877	Glucosyltransferase-S precursor. Glycoside hydrolase family 70	0.17	3.13
	SalivC0944	Predicted cell wall surface lipoprotein. Fibronectin type III domain		10.09
	SalivC1005	Exopolysaccharide biosynthesis protein. Galactosyl transferase		3.23
	SalivC1006	Exopolysaccharide biosynthesis protein. Glycosyl transferase family 1		3.77
	SalivC1007	Exopolysaccharide biosynthesis protein. Glycosyl transferase family 1		5.39
	SalivC1008	Exopolysaccharide biosynthesis protein. Rhamnosyltransferase		7.62
	SalivC1010	Exopolysaccharide biosynthesis protein. Glycosyl transferase family 2		4.80
	SalivC1011	Exopolysaccharide biosynthesis protein. Glycosyl transferase family 2		3.67
	SalivC1012	Exopolysaccharide biosynthesis protein. polysaccharide polymerase		5.97
	SalivC1013	Exopolysaccharide biosynthesis protein. polysaccharide Transporter		5.17
	SalivC1014	UDP-galactopyranose mutase		5.79
	SalivC1015	Galactofuranosyltransferase (GalF transferase)		17.27
	SalivC1174	Glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase		3.52
	SalivC1187	SCP-like extracellular protein		3.84
	SalivC1223	Extramembranal protein. D-alanyl transfer protein	3.70	4.29
	SalivC1225	Integral membrane protein. D-alanyl transfer protein		6.88
	SalivC1360	Glucosyltransferase-I		9.27
	SalivC1369	Glucosyltransferase-S precursor (GTF-S) (Dextranucrase)		7.31

SalivC1380	Glucosyltransferase-I		4.24
SalivC1399	Glucosyltransferase-S precursor (GTF-S) (Dextranucrase)		3.10
SalivC1404	Glycosyl transferase		4.49
SalivC1405	Lipopolysaccharide 1.2-glucosyltransferase. Glycosyl transferase family 8	6.25	8.17
SalivC1406	Galactofuranosyltransferase (GalF transferase)		5.99
SalivC1410	Glycosyl transferase family 1		9.34
SalivC1420	Predicted LPXTG cell wall surface protein. MUCB domain		4.10
SalivC1479	Polysaccharide biosynthesis protein. Glycosyl transferase family 2		3.86
SalivC1486	Glycosyl transferase family 2		5.79
Cell motility and secretion			
608711	Signal recognition particle GTPase		4.86
SalivC0488	Signal-petidase-like protein		5.01
SalivC0800	GTP-binding protein TypA/BipA (Tyrosine phosphorylated protein A)		3.30
SalivC0977	Signal peptidase I		4.40
SalivC1161	Signal recognition particle		3.32
SalivC1411	Protein translocase subunit secA		6.74
Inorganic ion transport and metabolism			
SalivC0193	ABC-type transport system involved in Fe-S cluster assembly. permease component		3.48
SalivC0295	Nickel/Cobalt ABC transporter. permease component		6.76
SalivC0752	Metal ion (Mn <sup>2+</sup> -iron) transporter (Nramp) family protein		2.80
SalivC0786	Metal (Manganese) ABC transporter. substrate-binding protein		4.27
SalivC0842	Zinc (Zn <sup>2+</sup> )/Iron (Fe <sup>2+</sup> ) Permease (ZIP) family protein		5.29
SalivC1058	Phosphate ABC transporter (import). ATPase component		6.88
SalivC1059	Phosphate ABC transporter (import). ATPase component		7.83
SalivC1061	Phosphate ABC transporter (import). permease component		3.00
SalivC1062	Phosphate ABC transporter (import). substrate-binding protein		3.59
SalivC1106	Ferrichrome/hemin-type ABC transporter. substrate-binding protein		5.30
SalivC1127	Nickel/Cobalt ABC transporter. ATPase component		7.85
SalivC1222	Ca <sup>2+</sup> . Mn <sup>2+</sup> -transporting P-type ATPase		4.56
Posttranslational modification, protein turnover, chaperones			
608661	Putative metallopeptidase (Zinc) SprT family		7.07
608714	Peptidase (caspase). family C14		3.87
SalivC0601	ATP-dependent Clp protease		5.60
SalivC0922	Zinc metalloprotease. M10A family		3.84
SalivC0978	Peptidase T		2.89
SalivC0988	Dipeptidase		4.03
SalivC1072	Thiol peroxidase. Tpx-type		7.24
SalivC1363	Endopeptidase O		5.41
Signal transduction mechanisms / Transcriptional regulators			
608710	Transcriptional regulator. XRE (Cro/Ci) family		5.19
608736	Signal transduction histidine kinase		7.06
608737	Two-component response regulator		6.65
SalivC0333	Biofilm regulatory protein A precursor. LytR family		3.35
SalivC0378	Transcriptional regulator. MarR family		5.67
SalivC0514	Bifunctional pyrimidine regulatory protein pyrR		4.89
SalivC0631	Transcriptional regulator. XRE (Cro/Ci) family		8.23
SalivC0665	Transcriptional regulator. LytR family		3.98

SalivC0721	Transcriptional regulator. TetR family	6.42
SalivC0741	HPr kinase/phosphorylase	9.17
SalivC0785	Mn-dependent transcriptional regulator MntR	4.88
SalivC0895	Transcriptional regulator. ArgR family	8.72
SalivC0958	Two-component response regulator	3.36
SalivC0959	Signal transduction histidine kinase	5.24
SalivC1159	Transcriptional regulator. birA repressor family	4.69
SalivC1162	Transcriptional regulator	3.71
SalivC1447	Phosphoprotein phosphatase	5.83
SalivC1547	Sensor histidine kinase (Homolog to BlpH Spn)	4.38
SalivC1599	Predicted Transcriptional repressor-copper transport operon	6.61
SalivC1675	Universal stress protein UspA or related nucleotide-binding protein	5.30
SalivC1861	Sensor histidine kinase (Homolog to BlpH Spn)	5.42
<b>Information storage and processing</b>		
DNA replication, recombination and repair		
608610	Type I restriction-modification system. restriction subunit R	9.23
608612	Type I restriction-modification system. specificity subunit S	9.54
608613	Type I restriction-modification system. specificity subunit S	12.30
SalivC0002	Beta subunit of DNA polymerase III	3.36
SalivC0271	Integrase/recombinase. tyrosine family	6.34
SalivC0587	DNA topoisomerase IV (Subunit C)	6.63
SalivC0891	Exodeoxyribonuclease VII. large subunit	6.54
SalivC0892	Exodeoxyribonuclease VII. small subunit	4.72
SalivC0896	DNA repair and genetic recombination protein	10.08
SalivC0913	DNA polymerase III subunit alpha	3.35
SalivC0934	DNA polymerase III subunit gamma/tau	4.82
SalivC1740	ATP-dependent nuclease subunit A (ATP-dependent helicase addA)	4.64
Transcription		
435599	Acetyltransferase (GNAT) family	4.46
SalivC0336	predicted nucleic-acid-binding protein	6.13
SalivC0827	ATP-dependent RNA helicase (Superfamily II DNA and RNA helicase)	3.69
SalivC1488	DNA-directed RNA polymerase. sigma subunit	7.27
SalivC1823	putative mRNA degradation ribonucleases J1/J2	3.53
Translation, ribosomal structure and biogenesis		
448988	tRNA pseudouridine synthase B (tRNA pseudouridine 55 synthase)	3.54
SalivC0052	Arginyl-tRNA synthetase (Arginine--tRNA ligase) (ArgRS)	5.20
SalivC0094	Cysteinyl-tRNA synthetase (Cysteine--tRNA ligase) (CysRS)	4.81
SalivC0337	LSU ribosomal protein L7AE	4.77
SalivC0411	CCA-adding enzyme (tRNA adenylyl-/cytidylyl- transferase)	5.15
SalivC0451	Alanyl-tRNA synthetase (Alanine--tRNA ligase) (AlaRS)	5.17
SalivC0501	Glycyl-tRNA synthetase beta subunit	4.61
SalivC0814	Isoleucyl-tRNA synthetase (Isoleucine--tRNA ligase) (IleRS)	8.10
SalivC0894	RRNA methylase. FtsJ-like methyltransferase family	7.34
SalivC1192	Endoribonuclease L-PSP	5.77
SalivC1195	Asparaginyl-tRNA synthetase (Asparagine--tRNA ligase) (AsnRS)	4.70
SalivC1232	Putative translation factor (SUA5)	4.89
SalivC1257	Phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain (PheRS)	3.69
SalivC1386	Probable Lysyl-tRNA synthetase. class II	7.59

Mobile and extrachromosomal element functions			
	SalivC0633	Integrase/recombinase. phage associated	6.70
<b>Metabolism</b>			2.72
Amino acid transport and metabolism			
	435558	Aspartate aminotransferase (aspartate transaminase)	6.72
	SalivC0356	Branched-chain amino acid ABC transporter. ATPase component	5.01
	SalivC0417	NADP-specific glutamate dehydrogenase	3.97
	SalivC0463	Homoserine dehydrogenase	4.68
	SalivC0656	Shikimate 5-dehydrogenase	5.88 6.21
	SalivC0659	Prephenate dehydrogenase	8.36
	SalivC0662	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase (EPSP synthase)	4.71
	SalivC0664	Prephenate dehydratase	6.79
	SalivC0732	SGNH-hydrolase superfamily (lipases and esterases)	5.77
	SalivC0826	Carbamoyl-phosphate synthase large chain	
	SalivC0864	Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase (IGPD)	5.39
	SalivC0898	SGNH-hydrolase superfamily (lipases and esterases)	10.34
	SalivC0908	2-isopropylmalate synthase	4.49
	SalivC1025	lipase/acylhydrolase. GDSL family	19.82
	SalivC1132	Choline/proline/glycine betaine ABC transporter. permease component and substrate-binding protein	5.86
	SalivC1133	Choline/proline/glycine betaine ABC transporter. ATPase component	5.14
	SalivC1170	Polar amino acid ABC transporter. substrate-binding protein	5.62
	SalivC1171	Polar amino acid ABC transporter. ATPase component	8.30
	SalivC1217	Methylenetetrahydrofolate reductase	5.04
	SalivC1218	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine S-Methyltransferase (or methionine synthase)	5.32
	SalivC1231	Serine hydroxymethyltransferase (Serine methylase) (SHMT)	12.16
	SalivC1463	Oligopeptide ABC uptake transporter. substrate-binding protein	6.19
	SalivC1464	Oligopeptide ABC uptake transporter. substrate-binding protein	6.67
	SalivC1471	Probable cysteine desulfurase (Aminotransferase Class V)	2.96
	SalivC1531	Polyamine (Putrescine/spermidine) ABC transporter. substrate-binding protein	3.19
	SalivC1589	Polar amino acid ABC transporter. substrate-binding protein	2.74
	SalivC1606	Anthranilate synthase component II (Glutamine amido-transferase)	4.09
	SalivC1640	Dihydroxy-acid dehydratase (DAD)	4.92
	SalivC1866	Oligopeptide ABC uptake transporter. substrate-binding protein	6.63
Carbohydrate transport and metabolism			
	435594	Putative exopolysaccharide exporter (EPS-E) family protein	10.56
	SalivC0123	6-phospho-beta-galactosidase. Glycoside hydrolase family 1	6.55
	SalivC0765	Phosphoglycerate mutase	4.06
	SalivC0838	Phosphoglucosamine mutase	2.93
	SalivC0915	Pyruvate kinase	4.29
	SalivC0993	Ribose-5-phosphate isomerase	2.56
	SalivC1019	phosphoglycerate mutase gpmB	3.81
	SalivC1039	pullulanase or alpha-amylase. Glycoside hydrolase family 13	4.38
	SalivC1046	Maltodextrin ABC transporter. ATPase component	8.56
	SalivC1047	Maltodextrin ABC transporter. permease component	4.80
	SalivC1048	Maltodextrin ABC transporter. permease component	6.03

SalivC1051	4-alpha-glucanotransferase	12.50	14.32
SalivC1052	Glycogen phosphorylase (Maltodextrin phosphorylase). Glycosyl transferase family 3	11.11	8.08
SalivC1202	Carbohydrate (Ribose/galactose) ABC transporter. ATPase component		6.03
SalivC1278	Fructan beta-fructosidase precursor (Fructanase)		4.75
SalivC1314	Mannose-6-phosphate isomerase		5.85
SalivC1358	glycerone kinase		4.64
SalivC1435	Pullulanase precursor. Glycoside hydrolase family 13		12.46
SalivC1773	Fructokinase		4.33
Coenzyme metabolism			
SalivC0400	Thiamine biosynthesis protein ThiI		5.17
SalivC0639	Dephospho-CoA kinase (Dephosphocoenzyme A kinase )		4.42
SalivC0671	Ubiquinone/menaquinone biosynthesis methyltransferase ubiE		4.57
SalivC1024	Ubiquinone biosynthesis protein ubiB (2-octaprenylphenol hydroxylase)		8.38
SalivC1239	Lipoprotein involved thiamine biosynthesis		2.58
Energy production and conversion			
SalivC0369	Probable manganese-dependent inorganic pyrophosphatase (Pyrophosphate phospho-hydrolase) (PPase)		4.03
SalivC0475	ATP synthase B chain		5.48
SalivC0476	H+-translocating ATPase delta subunit		6.82
SalivC0477	ATP synthase subunit alpha (ATPase subunit alpha )		6.86
SalivC0478	ATP synthase gamma chain		5.61
SalivC0479	ATP synthase subunit beta (ATPase subunit beta)		11.35
SalivC0818	Aconitate hydratase	20.00	6.08
SalivC1166	Alcohol dehydrogenase 1		8.82
Lipid metabolism			
SalivC0379	beta-ketoacyl-acyl-carrier-protein synthase III	2.63	5.87
SalivC0636	Diacylglycerol kinase (DAGK) (Diglyceride kinase) (DGK)		2.79
SalivC1267	Cardiolipin synthetase (Cardiolipin synthase) (CL synthase)		5.37
SalivC1560	Diacylglycerol kinase. YegS/Rv2252/BmrU family		4.69
Nucleotide transport and metabolism			
SalivC0030	Ribose-phosphate pyrophosphokinase		4.99
SalivC0039	Phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase		5.36
SalivC0348	Uracil phosphoribosyltransferase (UMP pyrophosphorylase) (UPRTase)	0.44	3.32
SalivC0516	Aspartate carbamoyltransferase (Aspartate transcarbamylase) (ATCase)		4.13
SalivC0994	Phosphopentomutase (Phosphodeoxyribomutase)		4.21
SalivC0999	Glutamine amidotransferase (GMP synthase)		3.22
SalivC1030	Dihydroorotase (DHOase)		6.51
SalivC1204	Cytidine deaminase		3.96
SalivC1205	Deoxyribose-phosphate aldolase		5.36
SalivC1236	Adenosine deaminase		5.13
Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism			
608564	Polyketide synthase		3.36
608565	Putative polyketide synthase PksJ		9.20
608566	Beta-ketoacyl synthase		13.83
608568	Polyketide synthase of type I		8.95
SalivC0632	Abortive infection bacteriophage resistance protein		5.45
SalivC0979	Pore-forming protein ebsA		3.80
SalivC1142	Diacetyl reductase [(R or S)-acetoin forming]		6.97



SalivC1228	Lipid/multidrug/protein-type ABC transporter. ATPase and permease components	3.34
SalivC1250	Hypothetical protein	5.50
SalivC1289	ABC transporter. ATPase component	6.51
SalivC1424	Multidrug-type ABC transporter. ATPase and permease component	3.38
SalivC1595	Lantibiotic/antimicrobial peptide-type ABC transporter. ATPase component	4.90
SalivC1658	isochorismatase family protein	2.67
SalivC1738	Multidrug-type ABC transporter. ATPase component	4.11
SalivC1747	Multidrug-type ABC transporter. ATPase component	4.72
<b>Poorly characterized</b>		
General function prediction only		
435553	Predicted phosphoesterase	4.06
SalivC0340	Decarboxylase family protein	4.92
SalivC0412	ABC transporter. ATPase component. drug resistance family protein	4.65
SalivC0637	GTP-binding protein	5.69
SalivC0654	SAM-dependent methyltransferase	4.90
SalivC0696	Hydrolase. alpha/beta domain protein	3.62
SalivC0960	Metal-dependent hydrolase of the beta-lactamase superfamily I	5.99
SalivC0975	Autoinducer-2 Exporter (AI-2E) Family protein (UPF0118) (PerM family)	4.88
SalivC0976	TPR repeat-containing protein ypiA	3.58
SalivC1021	Autoinducer-2 Exporter (AI-2E) Family protein (UPF0118) (PerM family)	7.93
SalivC1131	Predicted epimerase. Phenazine biosynthesis-like PhzC/PhzF protein	9.32
SalivC1185	Predicted P-loop-containing kinase (ATP-binding protein)	3.67
SalivC1230	Putative nucleoid-associated bacterial protein	7.29
SalivC1287	ABC transporter. permease component. DUF990 family	6.35
SalivC1503	GTP-binding protein. GTP1/Obg family	4.69
Function unknown		
435562	Alpha/beta hydrolase of unknown function (DUF915)	4.63
608667	Appr-1-p processing enzyme family protein	5.24
SalivC0252	Hypothetical protein	4.50
SalivC0408	Hypothetical protein	3.53
SalivC0454	Hypothetical protein	5.27
SalivC0582	Hypothetical protein	10.07
SalivC0648	Hypothetical protein	5.63
SalivC0650	Hypothetical protein	5.30
SalivC0660	Hypothetical protein	7.03
SalivC0783	Hypothetical protein	3.51
SalivC0836	Hypothetical protein	4.18
SalivC0849	Hypothetical protein	6.87
SalivC0897	DegV family protein	12.05
SalivC0899	Hypothetical protein	3.84
SalivC0938	Hypothetical protein	5.32
SalivC0939	Hypothetical protein	5.41
SalivC0940	Hypothetical protein	5.84
SalivC0945	Hypothetical protein. VTC domain	4.68
SalivC0995	Hypothetical protein	9.16
SalivC0997	Hypothetical protein	4.52
SalivC1023	Hypothetical protein	3.94

---

SalivC1031	Hypothetical protein	4.67
SalivC1069	Hypothetical protein	4.45
SalivC1186	Hypothetical protein	4.24
SalivC1194	Hypothetical protein	6.86
SalivC1197	Hypothetical protein	5.06
SalivC1280	Hypothetical protein	4.79
SalivC1285	Hypothetical protein	8.06
SalivC1301	Hypothetical protein	9.70
SalivC1485	Hypothetical protein	4.83
SalivC1557	Hypothetical protein	6.19
SalivC1594	Hypothetical protein	6.50
SalivC1627	Hypothetical protein	4.89
SalivC1744	Hypothetical protein	5.07
SalivC1871	Hypothetical protein	4.35
SalivC1990	Hypothetical protein	7.19

---

Table 4: Genes down-regulated in sample B (57.5 h culture) compared to sample C (72 h culture).

Functional category	Locus tag	Assignment	Ratio (RT-qPCR)	Ratio ( $\mu$ -array)
<b>Cellular processes</b>				
Cell division and chromosome partitioning				
	435563	Cell division protein FtsK		0,052
Cell envelope biogenesis, outer membrane				
	435586	Alpha-1,3-glucanase, Carbohydrate Binding Module 6 (CBM6) domains		0,054
	608599	Cell surface protein		0,109
	SalivC0010	Beta-lactamase class A		0,075
	SalivC0188	Undecaprenyl-diphosphatase		0,134
	SalivC0341	UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate-L-lysine ligase		0,029
	SalivC0342	Polysaccharide Transport (PST) Family protein		0,040
	SalivC0556	Glycosyl transferase family 1		0,050
	SalivC0844	Predicted esterase (glucan-binding protein D)	0,20	0,052
	SalivC1372	Glucosyltransferase-S precursor (GTF-S) (Dextranucrase)		0,091
	SalivC1706	Beta-lactamase/transpeptidase-like protein		0,107
	SalivC1725	phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide transferase, Glycosyl transferase family 4		0,050
	SalivC1728	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase mraW		0,052
Cell motility and secretion				
	SalivC1044	Sec-independent protein translocase protein tatA, putative		0,186
Inorganic ion transport and metabolism				
	SalivC0491	Ammonium Channel transporter (Amt family)		0,139
	SalivC0606	Ferrous ion uptake protein A		0,023
	SalivC0691	Zinc (Zn <sup>2+</sup> )/Iron (Fe <sup>2+</sup> ) Permease (ZIP) family protein		0,177
	SalivC0692	Zinc (Zn <sup>2+</sup> )/Iron (Fe <sup>2+</sup> ) Permease (ZIP) family protein		0,150
	SalivC0709	Ferrichrome/hemin-type ABC transporter, ATPase component		0,060
	SalivC0925	Chloride Carrier/Channel (ClC) family protein [H(+)/Cl(-) exchange Transporter clcA]		0,304
	SalivC1117	Cation diffusion facilitator (CDF) family protein (Zinc transporter zitB)		0,006
Posttranslational modification, protein turnover, chaperones				
	SalivC0747	Peptidase (Collagenase), U32 family		0,023
	SalivC1688	ATP-dependent protease La		0,078
	SalivC1900	CAAX amino terminal protease family		0,086
	SalivC2041	Exported serine protease HtrA		0,244
	SalivC1499	CAAX amino terminal protease family		0,292
	608619	Peptidase, M23 family		0,039
Signal transduction mechanisms / Transcriptional regulators				
	SalivC1389	transcriptional regulator, XRE (Cro/Cl) family		0,052
	SalivC1446	Protein kinase		0,051
	SalivC1528	Putative Bifunctional Sugar kinase and transcription regulator, ROK family		0,129
<b>Information storage and processing</b>				
DNA replication, recombination and repair				
	SalivC0059	DNA mismatch repair protein mutL		0,086
	SalivC0061	crossover junction endodeoxyribonuclease (Holliday junction ATP-dependent DNA helicase ruvA)		0,071

SalivC0163	MutT/NUDIX hydrolase family protein		0,014
SalivC0577	DNA topoisomerase IV (Subunit B)		0,212
SalivC0773	Type I restriction-modification system, restriction subunit R		0,043
SalivC1475	DNA repair protein radC homolog		0,067
SalivC1497	UvrABC system protein B (Protein uvrB) (Excinuclease ABC subunit B)	0,48	0,007
SalivC1561	DNA ligase (Polydeoxyribonucleotide synthase [NAD+])		0,009
SalivC1701	DNA polymerase IV, damage-inducible		0,017
SalivC1816	Exodeoxyribonuclease V		0,227
SalivC1836	CMP-binding factor		0,116
SalivC1891	Single-stranded DNA-binding protein		0,173
SalivC2030	DNA replication and repair protein recF		0,071
<b>Transcription</b>			
SalivC1724	ATP-dependent RNA helicase (Superfamily II DNA and RNA helicase)		0,007
<b>DNA transformation</b>			
SalivC0089	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase (Polynucleotide phosphorylase) (PNPase)		0,051
SalivC0282	transport/processing ATP-binding protein comA		0,193
SalivC0360	Late competence protein required for DNA uptake		0,041
SalivC0444	Competence protein, transcription factor		0,025
SalivC1571	Late competence protein required for DNA uptake, hydrolase		0,187
SalivC1909	Late competence protein, ABC transporter subunit	0,13	0,192
SalivC1910	Late competence protein, ABC transporter subunit		0,057
<b>Translation, ribosomal structure and biogenesis</b>			
SalivC0165	Ribosomal protein L11 methyltransferase (L11 Mtase)		0,068
SalivC0166	16S ribosomal RNA methyltransferase RsmE		0,003
SalivC0222	Uncharacterized RNA pseudouridine synthase yhcT (RNA- uridine isomerase)		0,202
SalivC0373	TRNA methyltransferase, TrmA family		0,018
SalivC0407	Acetyltransferase, including N-acetylase of ribosomal protein		0,070
SalivC0536	Pseudouridine synthase		0,122
SalivC1077	tRNA modification GTPase trmE		0,063
SalivC1439	Probable 16S rRNA-processing protein rimM		0,034
SalivC1466	Uncharacterized RNA pseudouridine synthase yjbO (RNA- uridine isomerase)		0,331
SalivC1583	Peptide chain release factor 3 (RF-3)		0,089
SalivC1677	pyruvate formate-lyase-activating enzyme (PFL-activating enzyme)		0,324
SalivC1851	Queuine tRNA-ribosyltransferase (tRNA-guanine transglycosylase)		0,145
<b>Mobile and extrachromosomal element functions</b>			
SalivC0616	Hypothetical protein		0,114
SalivC2000	Hypothetical protein		0,352
44211	IS1193, transposase, ISL3 family		0,089
435583	IS1193, transposase, ISL3 family		0,099
435890	Degenerated IS657, transposase, IS200 family		0,138
608591	IS1193, transposase, ISL3 family		0,015
<b>Metabolism</b>			
<b>Amino acid transport and metabolism</b>			
SalivC0286	Urea transporter, Urea/Amide Channel (UAC) Family protein	0,49	0,029
SalivC0461	Acetylornithine aminotransferase		0,090
SalivC0572	L-Arginine permease		0,201

SalivC0573	Homocysteine S-methyltransferase		0,030
SalivC1516	Phosphoserine phosphatase		0,199
SalivC1592	Polar amino acid ABC transporter, permease component		0,062
SalivC1694	Polar amino acid ABC transporter, permease component (putative Cysteine uptake)		0,258
SalivC1758	L-asparaginase		0,126
<b>Carbohydrate transport and metabolism</b>			
449001	PTS system beta-glucoside-specific EIIBC component (EIIBC-Bgl) (EIIBC-Bgl)		0,180
SalivC0203	Auxin efflux carrier (AEC) family protein, putative malate permease		0,020
SalivC0394	1-phosphofructokinase (Fructose 1-phosphate kinase)		0,143
SalivC0446	Oxalate:formate antiporter, Major Facilitator Superfamily (MFS) protein		0,406
SalivC1671	6-phospho-beta-glucosidase, Glycoside hydrolase family 1		0,025
SalivC1709	Glycerol uptake facilitator, Major Intrinsic Protein (MIP) Family protein		0,186
SalivC1929	PTS system trehalose-specific EIIBC component (EIIBC-Tre)		0,083
<b>Coenzyme metabolism</b>			
SalivC0149	Phosphomethylpyrimidine kinase		0,055
SalivC0294	Nickel/Cobalt ABC transporter, permease component		0,022
SalivC1378	Pyridoxine biosynthesis protein pdxT, glutamine amidotransferase		0,095
SalivC1540	Dihydropteroate synthase /		0,140
SalivC1838	Thiamine diphosphokinase (Thiamine pyrophosphokinase (TPK))		0,047
SalivC1882	5-Formyltetrahydrofolate cyclo-ligase family protein		0,093
SalivC1936	Glutamate-cysteine ligase		0,029
<b>Energy production and conversion</b>			
SalivC0468	Flavoredoxin / Flavin reductase-like domain protein		0,020
<b>Lipid metabolism</b>			
SalivC0226	Phosphatidylglycerophosphatase B		0,036
SalivC0545	Mevalonate kinase		0,013
SalivC1967	O-acetyltransferase oatA	2,63	0,177
<b>Nucleotide transport and metabolism</b>			
SalivC0035	Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase (SAICAR synthetase)		0,034
SalivC0036	Phosphoribosylformylglycinamide synthase II (FGAM synthetase)		0,036
<b>Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism</b>			
SalivC0421	Multidrug ABC exporter (DrugE2) family, ATP binding/membrane-spanning protein		0,252
SalivC0520	Macrolide-type ABC transporter (ABC-MacB family), substrate-binding protein		0,059
SalivC0522	Macrolide-type ABC transporter (ABC-MacB family), permease component		0,076
SalivC1105	MATE efflux family protein (Na+)/drug antiporter		0,032
SalivC1646	Lipid/multidrug/protein-type ABC transporter, ATPase component		0,195
SalivC1664	Drug/metabolite transporter (DMT) superfamily protein		0,340
SalivC1716	Multidrug-type ABC transporter (ABC-LipidE), ATPase and permease component		0,194
SalivC1812	CvpA family protein		0,357
SalivC1922	MATE efflux family protein (Na+)/drug antiporter		0,054
<b>Poorly characterized</b>			
<b>General function prediction only</b>			
SalivC0098	Hypothetical protein		0,268
SalivC0423	Acetyltransferase (GNAT) family		0,428

---

SalivC0465	RarD permease (Drug/Metabolite Transporter (DMT) Superfamily)	0,064
SalivC0764	Hypothetical protein	0,059
SalivC1288	ABC transporter, permease component, DUF990 family	0,030
SalivC1303	Predicted Fe-S-cluster oxidoreductase	0,013
SalivC1454	Phosphatase yidA (HAD superfamily hydrolase)	0,187
SalivC1687	Predicted Fe-S oxidoreductase (radical SAM protein)	0,080
SalivC1739	Hypothetical protein	0,017
SalivC1757	HAD superfamily hydrolase	0,038
SalivC1807	ABC transporter, permease subunit	0,147
SalivC1840	Probable GTPase engC	0,050
Function unknown		
435567	Hypothetical protein	0,050
608665	Hypothetical protein	0,084
SalivC0303	Putative S-adenosyl-L-methionine hydroxide adenosyltransferase	0,191
SalivC0413	Hypothetical protein	0,077
SalivC0436	Hypothetical protein	0,198
SalivC0498	Hypothetical protein	0,103
SalivC0508	Hypothetical protein	0,056
SalivC0730	Hypothetical protein	0,081
SalivC0779	Hypothetical protein	0,006
SalivC0856	Hypothetical protein	0,081
SalivC0871	Hypothetical protein	0,274
SalivC1584	Hypothetical protein	0,176
SalivC1586	Hypothetical protein	0,246
SalivC1699	Hypothetical protein	0,016
SalivC1792	Hypothetical protein	0,066
SalivC1828	Hypothetical protein	0,086
SalivC1895	Hypothetical protein	0,333
SalivC2005	Hypothetical protein	0,263
SalivC2020	Transglycosylase-like domain	0,078

---

### **IV.3.3 Conclusion sur l'effet de la dynamique buccale simulée en bioréacteur sur *S. salivarius* K12**

La troisième partie de ce travail a permis d'étudier les réponses mises en place par *S. salivarius* K12 en conditions de culture continue simulant la dynamique buccale, en milieu salive artificielle et avec des apports programmés de nutriments. Elle met en évidence une bonne adaptation de cette bactérie aux taux de dilution appliqués, comme le montre la stabilité de la consommation de KOH et de la cultivabilité pendant 4 jours de culture. En particulier, les cellules démontrent une bonne capacité à se maintenir en conditions de carence en source carbonée et à reprendre rapidement leur croissance, même après 14,5 h de carence nutritionnelle.

Ces observations ont été confirmées par des mesures de viabilité et mortalité cellulaire. Le taux de cellules viables se maintient au dessus de 86% tout au long de la culture. En phase stationnaire avancée, la viabilité diminue légèrement mais revient à sa valeur initiale dès la réintroduction de nutriments. *S. salivarius* K12 est donc capable de recouvrer rapidement ses capacités métaboliques après une phase de carence carbonée. Cette hypothèse est confirmée par l'absence de temps de latence après ajout de la solution nutritive.

Une étude comparative à l'échelle du transcriptome a permis d'émettre des hypothèses pour expliquer cette adaptation de *S. salivarius* K12 aux conditions dynamiques simulant celles de la bouche. Au moment où le glucose est épuisé, les cellules qui expriment encore des gènes nécessaires à leur croissance, expriment également des gènes de régulation et d'utilisation des voies de sources alternatives de carbone. L'induction de gènes liés à la formation de biofilms et à la constitution de réserves énergétiques est également suggérée lors de l'entrée en carence. En revanche, en fin de phase stationnaire, plusieurs gènes majoritairement exprimés sont relatifs à la compétence et à la réparation de l'ADN. Ces résultats suggèrent que *S. salivarius* K12 s'adapte à la phase stationnaire en augmentant sa compétence génétique naturelle et par une éventuelle utilisation de l'ADN comme source énergétique.

En conclusion, ce travail montre que *S. salivarius* est capable de mettre en place plusieurs stratégies complémentaires, qui lui permettent de survivre en condition de carence nutritionnelle, puis de reprendre sa croissance rapidement et efficacement lorsque les conditions nutritionnelles redeviennent favorables.

## V. Conclusion générale

*Streptococcus salivarius* est une espèce bactérienne prédominante dans la cavité orale humaine, localisée principalement dans la salive et au niveau des muqueuses, et qui ne présente pas de caractère pathogène au sein de la bouche. Ainsi, contrairement aux agents étiologiques buccaux, peu d'études ont porté sur son métabolisme et ses cinétiques de croissance. La découverte récente de propriétés « bénéfiques pour l'hôte » chez *S. salivarius* a stimulé l'intérêt de la communauté scientifique pour cette bactérie, et notamment pour la souche K12, productrice de bactériocines. Toutefois, l'impact de l'environnement buccal (pH, température, potentiel redox, composés salivaires, disponibilité en nutriments et lessivage lié à la déglutition) sur la physiologie de ces bactéries n'est pas connu, alors que de nombreux paramètres sont susceptibles d'interférer avec leur croissance et leur maintenance.

Dans ce contexte, **l'objectif de cette thèse** était de mieux comprendre le comportement de *S. salivarius* et les phénomènes physiologiques associés, dans des conditions simulant celles de la bouche, en bioréacteur. Une démarche en trois étapes a permis de s'approcher des conditions orales, en complexifiant progressivement le modèle :

- 1- Création d'une salive artificielle et caractérisation de la croissance de *S. salivarius* K12 dans ce milieu de culture, dans des conditions de pH et de température mimant les conditions orales ;
- 2- Etude de l'effet de l'ajout individuel de trois enzymes salivaires, de l'injection d'air expiré et de l'addition de saccharose dans les conditions retenues à l'issue de la phase précédente ;
- 3- Etude en culture continue de l'effet d'apports nutritionnels séquentiels dans un flux salivaire continu mais variable, en associant les conditions identifiées aux étapes précédentes (salive artificielle additionnée d'enzymes, conditions physico-chimiques buccales, injection d'air expiré).

Dans **la première partie de ce travail**, la salive artificielle créée se rapproche de la salive réelle de part sa composition ionique et ses concentrations en protéines et en urée. Une solution nutritive représentative d'un « repas » a été ajoutée à la salive artificielle, dans des conditions de pH et de température proches de celles rencontrées dans la bouche. Dans ces conditions, la croissance de *S. salivarius* K12 est rapide, avec un temps de latence nul et un taux de croissance



élevé. En revanche, en phase de maintenance, l'état physiologique des cellules se dégrade d'avantage que dans un milieu plus riche. Ceci s'explique par une plus faible quantité dans le milieu salivaire des protéines impliquées dans le métabolisme énergétique et celui du glycogène. La première partie de cette thèse a donc permis de valider l'utilisation de la salive artificielle créée comme milieu de culture pour *S. salivarius* K12 dans des conditions buccales de pH et de température.

**Dans la deuxième partie de la thèse**, l'effet individuel de cinq paramètres buccaux (trois enzymes à leurs concentrations physiologiques salivaires, injection d'air expiré, apport de saccharose) a été étudié de façon indépendante chez *S. salivarius* K12. La diminution de viabilité observée en présence de lysozyme a été expliquée par l'action de cette enzyme sur la paroi des bactéries. L'amylase agit à la fois positivement (accroissement de la disponibilité des substrats) et négativement (diminution du taux de croissance). La diminution du potentiel redox sous l'action de la peroxydase stimule la croissance de la bactérie, alors que l'injection d'air expiré l'inhibe partiellement, causée par l'augmentation du potentiel redox. Ces résultats confirment l'importance de ce paramètre chez *S. salivarius* K12. Enfin, l'introduction de saccharose, variable liée au comportement alimentaire de l'hôte, s'est traduite par une diminution de la viabilité, en lien avec la production accrue d'acide lactique. L'ensemble de ces résultats indiquent que ces facteurs de l'environnement buccal influencent l'état physiologique de *S. salivarius*, mais n'empêchent pas sa croissance. Il est donc nécessaire de les prendre en compte pour les études ultérieures impliquant cette bactérie, et probablement aussi pour l'étude du comportement des autres microorganismes de la bouche.

**Dans la troisième partie de cette thèse**, afin de prendre en compte l'effet global des facteurs environnementaux, ces derniers ont été combinés (à l'exception de l'amylase et du saccharose) en salive artificielle. La croissance et la maintenance de *S. salivarius* K12 ont ensuite été étudiées en culture continue dans ce milieu. Le procédé de fermentation mis en œuvre mime la dynamique des conditions buccales en associant un flux salivaire, variable selon les périodes de la journée, à l'introduction intermittente de nutriments de façon à simuler des « repas ». A notre connaissance, la variation des flux salivaires n'a jamais été prise en compte. Ainsi, ce mode de culture est bien adapté à l'étude *in vitro* du comportement des bactéries buccales, car il respecte la composition de la salive (ions, protéines, enzymes salivaires), les conditions d'environnement de la bouche (pH, température, injection d'un gaz correspondant à l'air expiré), et simule les flux caractéristiques de la cavité buccale (flux de salive et de nutriments).

Cette approche a permis de caractériser les réponses, à plusieurs échelles d'étude, de *S. salivarius* K12 soumis à l'alternance de périodes d'apport de nutriments et de périodes de carence en substrat carboné. Les résultats obtenus aux échelles macroscopiques et cellulaires montrent que les cellules assurent leur maintenance pendant les périodes de carence nutritionnelle (phase stationnaire) et reprennent rapidement leur métabolisme et leur croissance dès l'ajout de nutriments. L'analyse comparative du transcriptome, en début et en fin de phase de carence nutritionnelle explique en partie ces propriétés. En début de carence, *S. salivarius* K12 met en place différentes stratégies d'adaptation pour se préparer au stress nutritionnel : expression de gènes correspondant à l'utilisation de sources de carbone alternatives, au stockage de l'énergie (glycogène, EPS) et à la formation de biofilms. En fin de carence, les gènes de stockage du glycogène ne sont plus induits, ce qui pourrait expliquer pourquoi une faible quantité de protéines relatives au glycogène avait été observée dans le milieu salive par rapport à un milieu plus riche. L'induction en fin de carence de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN et la compétence a deux conséquences possibles : l'adaptation cellulaire en augmentant les potentialités génétiques et l'utilisation de l'ADN comme nutriment, en lien avec le maintien de *S. salivarius* en phase stationnaire. Ainsi, ce travail décrit les différentes modalités mises en œuvre par *S. salivarius* K12 pour se protéger du stress induit par la carence nutritionnelle, et redémarrer rapidement sa croissance, dès que les conditions nutritionnelles redeviennent favorables.

**L'ensemble de ce travail** en lien avec les cinétiques de croissance de *S. salivarius* a donc permis le développement d'un protocole pour l'étude des bactéries buccales. Cependant, le modèle reste simplifié et des évolutions sont nécessaires en fonction des objectifs ciblés. La complexification des conditions de culture et l'approche étape par étape mise en place a permis de montrer que *S. salivarius* est bien adapté à son environnement naturel : la bouche. Son taux de croissance rapide lui permet notamment d'éviter un lessivage lors d'une culture continue, et par extrapolation, lors des phénomènes de déglutition. De plus, la croissance de cette bactérie n'est pas empêchée par la présence de certaines enzymes antibactériennes retrouvées dans la salive ou de certains facteurs buccaux physico-chimiques (lysozyme, amylase, peroxidase, air expiré, saccharose). Enfin, les mécanismes moléculaires mis en place lors d'une carence nutritionnelle permettent à cette bactérie de se maintenir avec une bonne viabilité durant l'absence de nutriments, et de recouvrir ses capacités métaboliques dès la réintroduction de sources nutritionnelles. Cette faculté est un atout pour une bactérie buccale subissant les alternances de carences et d'excès nutritionnels. Ainsi, ces résultats mettent en lumière des phénomènes pouvant justifier la prédominance de l'espèce *S. salivarius* dans la cavité buccale.

Ce travail étant l'un des premiers décrivant les cinétiques de croissance et de maintenance de *S. salivarius*, il ouvre plusieurs **perspectives de recherche**.

Certains paramètres endogènes, qui n'ont pas pu être pris en compte lors de la thèse, devront être étudiés dans le futur. Il s'agit tout d'abord de compléter l'étude réalisée sur les enzymes salivaires, en associant d'autres enzymes plus mineures (lipases, protéases), mais qui peuvent avoir un effet sur le comportement des bactéries, et en utilisant différentes concentrations physiologiques. Les effets d'autres composés salivaires (lactoferrine, protéines riches en proline, immunoglobulines...) doivent également être testés. L'utilisation de techniques de biologie moléculaire permettra de préciser les réponses métaboliques apportées par *S. salivarius* en présence de ces facteurs buccaux, et d'identifier les gènes spécifiques des réponses associées. Une complexification de la salive artificielle pourrait alors être envisagée, pour prendre en compte tous les facteurs influant sur la croissance microbienne. Cette approche pourrait, en outre, être validée par la mise en culture de *S. salivarius* en salive réelle, à condition toutefois de pouvoir effectuer un traitement thermique préalable, non dégradant pour ses composants.

L'effet des facteurs exogènes, qui sont en lien avec le comportement alimentaire de l'hôte, doit également être complété. Ainsi, il conviendra d'étudier comment *S. salivarius* s'adapte à des apports nutritifs réalisés à des rythmes variables, et de compositions diverses (protéines, lipides, sels, acides, alcools, vitamines...). Du comportement alimentaire dépendent, en outre, des changements de température buccale (absorption d'aliments chauds ou froids) et de pH, qu'il sera également judicieux de prendre en considération.

*S. salivarius* étant une bactérie présente dans la salive mais également sur le dos de la langue et sur les muqueuses buccales, la mise en œuvre de cultures continues en biofilms permettrait de simuler les conditions rencontrées par la bactérie sur ces muqueuses. Il est en effet probable que les résultats obtenus en culture planctonique diffèrent de ceux qui seraient acquis en biofilm, comme cela a été démontré pour d'autres microorganismes. Une étude en biofilm permettrait, en outre, d'identifier les mécanismes d'adhésion éventuels de la bactérie, dans des conditions simulant les conditions réelles. Cependant, le dispositif opératoire est complexe à mettre au point, puisque la seule étude disponible sur ce sujet s'appuie sur un biofilm réalisé à partir d'une surface minérale, très éloignée de la structure biologique de la langue. Le développement de cultures cellulaires associant des cellules épithéliales de la langue pourrait servir de modèle comme support des biofilms linguaux. Cette approche permettrait, en outre, de prendre en compte

les interactions entre les bactéries et les cellules hôte, notamment les phénomènes de communication cellulaire.

Dans la bouche, *S. salivarius* est intégré à un écosystème buccal complexe, qui comprend plus de 500 espèces bactériennes. Le développement de cultures mixtes est donc une approche indispensable, afin de prendre en compte l'effet des phénomènes d'interactions microbiennes, qu'ils soient positifs (coopération, mutualisme) ou négatifs (compétition, inhibition entre espèces), sur la physiologie et les réponses métaboliques de *S. salivarius*. Ce système pourrait ensuite être utilisé afin d'identifier les facteurs d'environnement qui favorisent le développement de certaines espèces bactériennes, au détriment des autres. Il constituerait alors un outil intéressant pour comprendre les interactions bactériennes dans la bouche, en lien avec l'apparition de certains dysfonctionnements (halitose) ou maladies (caries, maladies parodontales).

Les résultats présentés dans ce travail concernent une souche bactérienne précise, *S. salivarius* K12. Or, des essais ont également été réalisés avec une autre souche, *S. salivarius* JIM8777, isolée par l'équipe Bactéries Alimentaires et Commensales (unité Micalis, INRA, Jouy-en-Josas). Les résultats obtenus avec cette souche n'ont pas pu être exploités car la bactérie, dans les conditions de l'étude, a démontré une très forte variabilité morphologique, rendant les mesures peu reproductibles et donc non exploitables. Dans le futur, il sera nécessaire d'élargir cette étude à d'autres souches de *S. salivarius*, à la fois pour valider les résultats obtenus et pour évaluer la diversité en termes d'implantation de l'espèce dans les conditions buccales.

*S. salivarius* K12 démontre des propriétés probiotiques en termes de lutte contre l'halitose et certaines affections bactériennes respiratoires. L'étude de ces propriétés, en particulier leur aptitude à produire des bactériocines, pourra être approfondie en utilisant les systèmes de culture présentés ici, en lien avec l'environnement buccal. Une telle étude permettra de mieux comprendre les mécanismes qui influent sur la production de ces bactériocines, afin de l'améliorer.

Finalement, les axes de recherche envisagés ici permettront d'accroître les connaissances autour de l'espèce *S. salivarius*, et notamment de son activité probiotique, afin de favoriser son utilisation et sa valorisation dans un contexte industriel.



## VI. Références bibliographiques

### A

- Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE (2005)** Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *Journal of Clinical Microbiology* 43:5721-5732
- Acuña G, Latrille E, Béal C, Corrieu G, Chéry A (1994)** On-line estimation of biological variables during pH controlled lactic acid fermentations. *Biotechnology and Bioengineering* 44:1168-1176
- Adak S, Mazumdar A, Banerjee RK (1997)** Low catalytic turnover of horseradish peroxidase in thiocyanate oxidation. *Journal of Biological Chemistry* 272:11049-11056
- Agha-Hosseini F, Dizgah IM, Amirkhani S (2006)** The composition of unstimulated whole saliva of healthy dental students. *The Journal of Contemporary Dental Practice* 7:104-111
- Ahumada Ostengo MC, Wiese B, Nader-Macias ME (2005)** Inhibitory effect of sodium fluoride and chlorhexidine on the growth of oral lactobacilli. *Canadian Journal of Microbiology* 51:133-140
- Almståhl A, Wikström M (2003)** Electrolytes in stimulated whole saliva in individuals with hyposalivation of different origins. *Archives of Oral Biology* 48:337-344
- Amrane A, Prigent Y (1999)** Differentiation of pH and free lactic acid effects on the various growth and production phases of *Lactobacillus helveticus*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 74:33-40
- Atlan D, Béal C, Champomier-Verges MC, Chapot-Chartier MP, Chouayehk I, Cocaign-**

### B

- Bousquet M, Deghorain M, Gaudu P, Gilbert C, Goffin P, Guédon E, Guillouard I, Guzzo J, Hols P, Juillard V, Maguin E, Monnet C, Monnet V, Rul F, Tourdot-Maréchal R, Yvon M (2008)** Métabolisme et ingénierie métabolique. In: Corrieu G, Luquet FM (eds) *Bactéries lactiques : de la génétique au ferments*, vol 1. Tec & Doc, Paris, pp 271-509
- Badet C, Thebaud NB (2008)** Ecology of lactobacilli in the oral cavity: a review of literature. *The Open Microbiology Journal* 2:38-48
- Bardow A, Moe D, Nyvad B, Nauntofte B (2000)** The buffer capacity and buffer systems of human whole saliva measured without loss of CO<sub>2</sub>. *Archives of Oral Biology* 45:1-12
- Barker MM, Gaal T, Josaitis CA, Gourse RL (2001)** Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. I. Effects of ppGpp on transcription initiation *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Molecular Biology* 305:673-688
- Barry SC (1966)** Carbohydrate metabolism of *Streptococcus salivarius*. II. Manometric measurements of oxygen consumption under various temperature, pH, and substrate concentration. *Journal of Dental Research* 45:874-876
- Barsotti O (2006)** Les principales bactéries de la flore buccale. In: Chardin H, Barsotti O, Bonnaure-Mallet M (eds) *Microbiologie en odonto-stomatologie*. Malloine, Paris, pp 3-63

- Basson NJ (2000)** Competition for glucose between *Candida albicans* and oral bacteria grown in mixed culture in a chemostat. *Journal of Medical Microbiology* 49:969-975
- Béal C, Marin M, Fontaine E, Fonseca F, Obert JP (2008)** Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. In: Corrieu G, Luquet FM (eds) *Bactéries lactiques : de la génétique au ferments*. Tec & Doc, Paris pp 661-785
- Belli WA, Marquis RE (1991)** Adaptation of *Streptococcus mutans* and *Enterococcus hirae* to acid stress in continuous culture. *Applied and Environmental Microbiology* 57:1134-1138
- Ben Amor K, Breeuwer P, Verbaarschot P, Rombouts FM, Akkermans ADL, De Vos WM, Abee T (2002)** Multiparametric flow cytometry and cell sorting for the assessment of viable, injured, and dead *Bifidobacterium* cells during bile salt stress. *Applied and Environmental Microbiology* 68:5209-5216
- Bender GR, Thibodeau EA, Marquis RE (1985)** Reduction of acidurance of streptococcal growth and glycolysis by fluoride and gramicidin. *Journal of Dental Research* 64:90-95
- Bentley RW, Leigh JA, Collins MD (1991)** Intrageneric structure of *Streptococcus* based on comparative-analysis of small-subunit ribosomal-RNA sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 41:487-494
- Bernhardt J, Weibezahn J, Scharf C, Hecker M (2003)** *Bacillus subtilis* during feast and famine: visualization of the overall regulation of protein synthesis during glucose starvation by proteome analysis. *Genome Research* 13:224-237
- Bowden GH, Hamilton IR (1998)** Survival of oral bacteria. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 9:54-85
- Boy-Lefevre M, Robert J (1993)** Colonisation bactérienne des surfaces dentaires et péri-dentaires. In: Goldberg M (ed) *tissus non minéralisés et milieu buccal*. Masson, Paris, pp 12-143
- Boyaval P (1989)** Lactic acid bacteria and metal ions. *Lait* 69:87-113
- Bradshaw D, Marsh P, Schilling K, Cummins D (1996a)** A modified chemostat system to study the ecology of oral biofilms. *Journal of Applied Microbiology* 80:124-130
- Bradshaw DJ, Homer KA, Marsh PD, Bighton D (1994)** Metabolic cooperation in oral microbial communities during growth on mucin. *Microbiology* 140:3407-3412
- Bradshaw DJ, Marsh PD, Allison C, Schilling KM (1996b)** Effect of oxygen, inoculum composition and flow rate on development of mixed-culture oral Biofilms. *Microbiology* 142:623-629
- Bradshaw DJ, Marsh PD, Hodgson RJ, Visser JM (2002)** Effects of glucose and fluoride on competition and metabolism within *in vitro* dental bacterial communities and biofilms. *Caries Research* 36:81-86
- Bradshaw DJ, McKee AS, Marsh PD (1989)** Effects of carbohydrate pulses and pH on population shifts within oral microbial communities *in vitro*. *Journal of Dental Research* 68:1298-1302
- Brandtzaeg PER (2007)** Do salivary antibodies reliably reflect both mucosal and systemic immunity? *Annals of the New York Academy of Sciences* 1098:288-311
- Brown CM, Snowdon CF, Slee B, Sandle LN, Rees WDW (1995)** Neural influences on human esophageal and salivary alkali secretion. *Digestive Diseases and Sciences* 40:1642-1650

- Bunthof CJ, van den Braak S, Breeuwer P, Rombouts FM, Abee T (2000)** Fluorescence assessment of *Lactococcus lactis* viability. *International Journal of Food Microbiology* 55:291-294
- Burne RA (1998)** Oral Streptococci... products of their environment. *Journal of Dental Research* 77:445-452
- Burne RA, Chen YYM, Wexler DL, Kuramitsu H, Bowen WH (1996)** Cariogenicity of *Streptococcus mutans* strains with defects in fructan metabolism assessed in a program-fed specific-pathogen-free rat model. *Journal of Dental Research* 75:1572-1577
- Burton J, Chilcott C, Wescombe P, Tagg J (2010)** Extended safety data for the oral cavity probiotic *Streptococcus salivarius* K12. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 2:135-144
- Burton J, Chilcott CN, Tagg JR (2005)** The rationale and potential for the reduction of oral malodour using *Streptococcus salivarius* probiotics. *Oral Diseases* 11:29-31
- Burton JP, Chilcott CN, Moore CJ, Speiser G, Tagg JR (2006a)** A preliminary study of the effect of probiotic *Streptococcus salivarius* K12 on oral malodour parameters. *Journal of Applied Microbiology* 100:754-764
- Burton JP, Cowley S, Simon RR, McKinney J, Wescombe PA, Tagg JR (2011)** Evaluation of safety and human tolerance of the oral probiotic *Streptococcus salivarius* K12: a randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Food and Chemical Toxicology* 49:2356-2364
- Burton JP, Wescombe PA, Moore CJ, Chilcott CN, Tagg JR (2006b)** Safety assessment of the oral cavity probiotic *Streptococcus salivarius* K12. *Applied and Environmental Microbiology* 72:3050-3053
- Busuioc M, Buttaro BA, Piggot PJ (2010)** The pdh operon is expressed in a subpopulation of stationary-phase bacteria and is important for survival of sugar-starved *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology* 192:4395-4402
- Busuioc M, Mackiewicz K, Buttaro BA, Piggot PJ (2009)** Role of intracellular polysaccharide in persistence of *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology* 191:7315-7322

## C

- Campbell NA, Reece JB (2001)** *Biologie*. 2 edn. De Boeck, Bruxelles
- Carda C, Mosquera-Lloreda N, Salom L, Gomez de Ferraris ME, Peydro A (2006)** Structural and functional salivary disorders in type 2 diabetic patients. *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal* 11:E309-314
- Carley NH (1992)** *Streptococcus salivarius* bacteremia and meningitis following upper gastrointestinal endoscopy and cauterization for gastric bleeding. *Clinical Infectious Diseases* 14:947-948
- Carlsson J (1971a)** Growth of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis* in mixed culture. *Archives of Oral Biology* 16:963-965
- Carlsson J (1971b)** Nutritional requirements of *Streptococcus salivarius*. *Journal of General Microbiology* 67:69-76
- Carlsson J (1984)** Regulation of sugar metabolism in relation to feast-and famine existence of plaque. In: Guggenheim B (ed) *Cariology today*. Karger, S, Bâle, Suisse, pp 205-211



- Carlsson J (1997)** Bacterial metabolism in dental biofilms. *Advances in Dental Research* 11:75-80
- Carlsson J, Iwami Y, Yamada T (1983)** Hydrogen peroxide excretion by oral streptococci and effect of lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide. *Infection and Immunity* 40:70-80
- Casianocolon A, Marquis RE (1988)** Role of the arginine deiminase system in protecting oral bacteria and an enzymatic basis for acid tolerance. *Applied and Environmental Microbiology* 54:1318-1324
- Chardin H (2006)** Interactions flore-hôte. In: Chardin H, Barsotti O, Bonnaure-Mallet M (eds) *Microbiologie en odonto-stomatologie*. Malloine, Paris, pp 165-191
- Chassy BM, Beall JR, Bielawski RM, Porter EV, Donkersloot JA (1976)** Occurrence and distribution of sucrose-metabolizing enzymes in oral streptococci. *Infection and Immunity* 14:408-415
- Chatterji D, Kumar Ojha A (2001)** Revisiting the stringent response, ppGpp and starvation signaling. *Current Opinion in Microbiology* 4:160-165
- Chavez de Paz LE, Hamilton IR, Svensater G (2008)** Oral bacteria in biofilms exhibit slow reactivation from nutrient deprivation. *Microbiology* 154:1927-1938
- Chen YM, Weaver CA, Burne RA (2000)** Dual Functions of *Streptococcus salivarius* Urease. *Journal of Bacteriology* 182:4667-4669
- Chen YY, Burne RA (1996)** Analysis of *Streptococcus salivarius* urease expression using continuous chemostat culture. *FEMS Microbiology Letters* 135:223-229
- Chen YYM, Betzenhauser MJ, Snyder JA, Burne RA (2002)** Pathways for lactose/galactose catabolism by *Streptococcus salivarius*. *FEMS Microbiology Letters* 209:75-79
- Chitra S, Shyamala Devi C (2008)** Effects of radiation and alpha-tocopherol on saliva flow rate, amylase activity, total protein and electrolyte levels in oral cavity cancer. *The Indian Journal of Medical Research* 19:213-218
- Choe E, Min DB (2005)** Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods. *Journal of Food Science* 70:R142-R159
- Chung W, Hancock REW (2000)** Action of lysozyme and nisin mixtures against lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 60:25-32
- Clements MO, Foster SJ (1998)** Starvation recovery of *Staphylococcus aureus* 8325-4. *Microbiology* 144:1755-1763
- Colby SM, Russell RRB (1997)** Sugar metabolism by mutans streptococci. *Journal of applied Microbiology Symposium Supplement* 26:80S-88S
- Conte A, Chinello P, Civljak R, Bellussi A, Noto P, Petrosillo N (2006)** *Streptococcus salivarius* meningitis and sphenoid sinus mucocele. Case report and literature review. *Journal of Infection* 52:e27-e30
- Corredoira JC, Alonso MP, García JF, Casariego E, Coira A, Rodriguez A, Pita J, Louzao C, Pombo B, López MJ, Varela J (2005)** Clinical characteristics and significance of *Streptococcus salivarius* bacteremia and *Streptococcus bovis* bacteremia: a prospective 16-year study. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 24:250-255
- Cosseau C, Devine DA, Dullaghan E, Gardy JL, Chikatamarla A, Gellatly S, Yu LL, Pistolic J, Falsafi R, Tagg J, Hancock REW (2008)** The commensal *Streptococcus salivarius* K12 downregulates the innate immune responses of human epithelial cells and promotes host-microbe homeostasis. *Infection and Immunity* 76:4163-4175

**Cotter PD, Hill C (2003)** Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiological and Molecular Biology Reviews* 67:429-453

**Cowman RA, Schaefer SJ, Fitzgerald RJ (1979)** Specificity of utilization of human salivary proteins for growth by oral Streptococci. *Caries Research* 13:181-189

**Crosse AM, Greenway DLA, England RR (2000)** Accumulation of ppGpp and ppGp in *Staphylococcus aureus* 8325-4 following nutrient starvation. *Letters in Applied Microbiology* 31:332-337

## D

**Dashper SG, Reynolds EC (1992)** pH Regulation by *Streptococcus mutans*. *Journal of Dental Research* 71:1159-1165

**Davies MJ, Hawkins CL, Pattison DI, Rees MD (2008)** Mammalian heme peroxidases: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxidants & Redox Signaling* 10:1199-1234

**Davies RC, Neuberger A, Wilson BM (1969)** The dependence of lysozyme activity on pH and ionic strength. *Biochemical and Biophysical Acta* 178:294-305

**Dawes C (1972)** Circadian rhythms in human salivary flow rate and composition. *The Journal of Physiology* 220:529-545

**Dawes C (1974)** Rhythms in salivary flow rate and composition. *International Journal of Chronobiology* 2:253-279

**Dawes C (1981)** The effects of exercise on protein and electrolyte secretion in parotid saliva. *The Journal of Physiology* 320:139-148

**Dawes C (1984)** Stimulus effects on protein and electrolyte concentrations in parotid saliva. *The Journal of Physiology* 346:579-588

**Dawes C (2004)** Factors influencing salivary flow rate and composition. In: Edgar WM, dawes C, O'Mullane DM (eds) *Saliva and oral health*. 3 edn. British dental association, London, UK, pp 32-49

**Dawes C (2008)** Salivary flow patterns and the health of hard and soft oral tissues. *Journal of the American Dental Association* 139 Suppl:18S-24S

**De Jong MH, Van Der Hoeven JS (1987)** The growth of oral bacteria on saliva. *Journal of Dental Research* 66:498-505

**De Jong MH, Van der Hoeven JS, Van Os JH, Olijve JH (1984)** Growth of oral *Streptococcus* species and *Actinomyces viscosus* in human saliva. *Applied and Environmental Microbiology* 47:901-904

**Del Vigna de Almeida P, Gregio AM, Machado MA, de Lima AA, Azevedo LR (2008)** Saliva composition and functions: a comprehensive review. *The Journal of Contemporary Dental Practice* 9:72-80

**Delorme C, Bartholini C, Bolotine A, Ehrlich SD, Renault P (2010)** Emergence of a cell wall protease in the *Streptococcus thermophilus* population. *Applied and Environmental Microbiology* 76:451-460

**Delorme C, Poyart C, Ehrlich SD, Renault P (2007)** Extent of Horizontal Gene Transfer in Evolution of Streptococci of the Salivarius Group. *Journal of Bacteriology* 189:1330-1341

- Derek WS, Harty DWS, Handley PS (1989)** Expression of the surface properties of the fibrillar *Streptococcus salivarius* HB and its adhesion deficient mutants grown in continuous culture under glucose limitation. *Journal of General Microbiology* 135:2611-2621
- Diaz PI, Zilm PS, Rogers AH (2000)** The response to oxidative stress of *Fusobacterium nucleatum* grown in continuous culture. *FEMS Microbiology Letters* 187:31-34
- Dierksen K, Moore C, Philip M, Wescombe A, Tagg JR (2007)** The effect of ingestion of milk supplemented with salivaricin A-producing *Streptococcus salivarius* on the bacteriocin-like inhibitory activity of streptococcal populations on the tongue. *FEMS Microbiology Ecology* 59:584-591
- Douglas CW (1983)** The binding of human salivary alpha-amylase by oral strains of streptococcal bacteria. *Archives of Oral Biology* 28:567 - 573
- Douglas CWI, Heath J, Gwynn JP (1992)** Enzymic activity of salivary amylase when bound to the surface of oral streptococci. *FEMS Microbiology Letters* 92:193-197
- Dumas C, Champagne A, Lavoie MC (1987)** Proteolytic activity of bacteria isolated from the oral cavities of BALB/c mice toward salivary proteins. *Journal of Dental Research* 66:62-64
- Duwat P, Ehrlich SD, Gruss A (1995)** The recA gene of *Lactococcus lactis*: characterization and involvement in oxidative and thermal stress. *Molecular Microbiology* 17:1121-1131
- Dziemiańczyk D, Grabowska S, Balicki R (2005)** Evaluation of secretory mucin concentration of patients with squamous cell carcinoma oral cavity. *Annales Academiae Medicae Bialostocensis* 50

## E

- Edgar WM (1990)** Saliva and dental health. Clinical implications of saliva: report of a consensus meeting. *British Dental Journal* 169:96-98
- EFSA QPS: Qualified presumption of safety of micro-organisms in food and feed.** In: Report SCS (ed), Brussels, Belgium, 2004.
- Elli M, Zink R, Rytz A, Reniero R, Morelli L (2000)** Iron requirement of *Lactobacillus spp.* in completely chemically defined growth media. *Journal of Applied Microbiology* 88:695-703
- Enberg N, Alho H, Loimaranta V, Lenander-Lumikari M (2001)** Saliva flow rate, amylase activity, and protein and electrolyte concentrations in saliva after acute alcohol consumption. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics* 92:292-298
- Engelen L, Van den Keybus PA, De Wijk RA, Veerman EC, Amerongen AV, Bosman F, Prinz JF, van der Bilt A (2007)** The effect of saliva composition on texture perception of semi-solids. *Archives of Oral Biology* 52:518-525
- Ericson T, Rundegren J (1983)** Characterization of a salivary agglutinin reacting with a serotype c strain of *Streptococcus mutans*. *European Journal of Biochemistry* 133:255-261
- Eskow RN, Loesche WJ (1971)** Oxygen tensions in the human oral cavity. *Archives of Oral Biology* 16:1127-1128

## F

- FAO** Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacterian. In: FAO / WHO, a joint expert consultation, Cordoba, Argentina, 2001.
- Farrow JAE, Collins MD (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
- Fenoll-Palomares C, Munoz Montagud JV, Sanchiz V, Herreros B, Hernandez V, Minguez M, Benages A (2004)** Unstimulated salivary flow rate, pH and buffer capacity of saliva in healthy volunteers. Revista española de enfermedades digestivas : organo oficial de la Sociedad Española de Patología Digestiva 96:773-783
- Fozo EM, Kajfasz JK, Quivey Jr RG (2004)** Low pH-induced membrane fatty acid alterations in oral bacteria. FEMS Microbiology Letters 238:291-295
- Frandsen EVG, Pedrazzoli V, Kilian M (1991)** Ecology of viridans streptococci in the oral cavity and pharynx. Oral Microbiology and Immunology 6:129-133
- Furtmuller PG, Burner U, Obinger C (1998)** Reaction of myeloperoxidase compound I with chloride, bromide, iodide, and thiocyanate. Biochemistry 37:17923-17930
- Furtmuller PG, Jantschko W, Regelsberger G, Jakopitsch C, Arnhold J, Obinger C (2002)** Reaction of lactoperoxidase compound I with halides and thiocyanate. Biochemistry 41:11895-11900

## G

- Gal J, Fovet Y, Adib-Yadzi M (2001)** About a synthetic saliva for in vitro studies. Talanta 53:1103-1115
- Gandara BK, Izutsu KT, Truelove EL, Mandel ID, Sommers EE, Ensign WY (1987)** Sialochemistry of whole, parotid, and labial minor gland saliva in patients with oral lichen planus. Journal of Dental Research 66:1619-1622
- Garcia-Mendoza A, Liebana J, Castillo AM, de la Higuera A, Piedrola G (1993)** Evaluation of the capacity of oral streptococci to produce hydrogen peroxide. Journal of Medical Microbiology 39:434-439
- Geiszt M, Witta J, Baffi J, Lekstrom K, Leto TL (2003)** Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense. The FASEB Journal
- Giard JC, Hartke A, Flahaut S, Boutibonnes P, Auffray Y (1997)** Glucose starvation response in *Enterococcus faecalis* JH2-2: survival and protein analysis. Research in Microbiology 148:27-35
- Gibbons RJ, De Stoppelaar JD, Harden L (1966)** Lysozyme insensitivity of bacteria indigenous to the oral cavity of man. Journal of Dental Research 45:877-881
- Gibbons RJ, Houte JV (1975)** Bacterial adherence in oral microbial ecology. Annual Review of Microbiology 29:19-42
- Gibbons RJ, Kapsimalis B, Socransky SS (1964)** The source of salivary bacteria. Archives of Oral Biology 9:101-103

- Gibbons RJ, Van Houte J, Liljemark WF (1972)** Parameters that effect the adherence of *Streptococcus salivarius* to oral epithelial surfaces. *Journal of Dental Research* 51:424-435
- Giliberti G, Naclerio G, Martirani L, Ricca E, De Felice M (2002)** Alteration of cell morphology and viability in a recA mutant of *Streptococcus thermophilus* upon induction of heat shock and nutrient starvation. *Gene* 295:1-6
- Gonçalves LMD, Ramos A, Almeida JS, Xavier AMRB, Carrondo MJT (1997)** Elucidation of the mechanism of lactic acid growth inhibition and production in batch cultures of *Lactobacillus rhamnosus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 48:346-350
- Gracieux P, Robert JC, Bonnaure-Mallet M (2006)** Les biofilms buccaux. In: Chardin H, Barsotti O, Bonnaure-Mallet M (eds) *Microbiologie en odonto-stomatologie*. Maloine, Paris, pp 141-160
- Gregory EM, Fridovich I (1973)** Induction of superoxide dismutase by molecular oxygen. *Journal of Bacteriology* 114:543-548
- Guggenheim B, Guggenheim M, Gmur R, Giertsen E, Thurnheer T (2004)** Application of the Zürich biofilm model to problems of cariology. *Caries research* 38:212-222
- Guglielmetti S, Taverniti V, Minuzzo M, Arioli S, Stuknyte M, Karp M, Mora D (2010)** Oral bacteria as potential probiotic for the pharyngeal mucosa. *Applied and Environmental Microbiology* 76:3948-3958
- Guillot A, Gitton C, Anglade P, Mistou MY (2003)** Proteomic analysis of *Lactococcus lactis*, a lactic acid bacterium. *PROTEOMICS* 3:337-354

## H

- Halliwell B, Gutteridge JMC (1990)** Role of free-radicals and catalytic metal-ions in human-disease - an overview. *Methods in Enzymology* 186:1-85
- Hamilton IR, Boyar RM, Bowden GH (1985)** Influence of pH and fluoride on properties of an oral strain of *Lactobacillus casei* grown in continuous culture. *Infection and Immunity* 48:664-670
- Hamilton IR, Lo GC (1978)** Co-induction of beta-galactosidase and the lactose-P-enolpyruvate phosphotransferase system in *Streptococcus salivarius* and *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology* 136:900-908
- Handley PS, Carter PL, Fielding J (1984)** *Streptococcus salivarius* strains carry either fibrils or fimbriae on the cell surface. *Journal of Bacteriology* 157:64-72
- Handley PS, Harty DWS, Wyatt JE, Brown CR, Doran JP, Gibbs ACC (1987)** A comparison of the adhesion, coaggregation and cell-surface hydrophobicity properties of fibrillar and fimbriate strains of *Streptococcus salivarius*. *Journal of General Microbiology* 133:3207-3217
- Hansson A, Giannouli P, van Ruth S (2003)** The influence of gel strength on aroma release from pectin gels in a model mouth and *in vivo*, monitored with proton-transfer-reaction mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:4732-4740
- Haraszthy VI, Zambon JJ, Sreenivasan PK, Zambon MM, Gerber D, Rego R, Parker C (2007)** Identification of oral bacterial species associated with halitosis. *Journal of the American Dental Association* 138:1113-1120

- Hark L, Deen D (2005)** Nutrition for life, vol 1. Dorling Kindersley, London, UK
- Haukioja A (2009)** Probiotic lactobacilli and bifidobacteria in the mouth. University of Turku, Turku
- Heintze U, Frostell G, Lindgarde F, Trell E (1986)** Secretion rate and buffer effect of resting and stimulated whole saliva in relation to general health. *Swedish Dental Journal* 10:213-219
- Higuchi M, Shimada M, Yamamoto Y, Hayashi T, Koga T, Kamio Y (1993)** Identification of two distinct NADH oxidases corresponding to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-forming oxidase and H<sub>2</sub>O-forming oxidase induced in *Streptococcus mutans*. *Journal of General Microbiology* 139:2343-2351
- Hojo S, Mitsutomi M, Yamada T (1987)** Metabolism of glycosylsucrose by oral microorganisms and its hydrolysis by *Streptococcus salivarius* fructosyltransferase. *Infection and Immunity* 55:698-703
- 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, Kleerebezem M (2005)** New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiology Reviews* 29:435-463
- Hope CK, Wilson M (2004)** Analysis of the effects of chlorhexidine on oral biofilm vitality and structure based on viability profiling and an indicator of membrane integrity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48:1461-1468
- Horz HP, Meinelt A, Houben B, Conrads G (2007)** Distribution and persistence of probiotic *Streptococcus salivarius* K12 in the human oral cavity as determined by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Oral Microbiology and Immunology* 22:126-130
- Humphrey SP, Williamson RT (2001)** A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *The Journal of Prosthetic Dentistry* 85:162-169
- Hussain MA, Knight MI, Britz ML (2009)** Proteomic analysis of lactose-starved *Lactobacillus casei* during stationary growth phase. *Journal of Applied Microbiology* 106:764-773
- Husson-Kao C, Mengaud J, Gripon J, Benbadis L, Chapot-Chartier MP (2000)** Characterization of *Streptococcus thermophilus* strains that undergo lysis under unfavourable environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology* 55:209-213
- Hyink O, Wescombe PA, Upton M, Ragland NL, Burton JP, Tagg JR (2007)** Salivaricin A2 and the novel lantibiotic salivaricin B are encoded at adjacent loci on a 190-kilobase transmissible megaplasmid in the oral probiotic strain *Streptococcus salivarius* K12. *Applied and Environmental Microbiology* 73:1107-1113
- Hyun K, Cheol A (2000)** Bacteriocin production by *Lactococcus lactis* KCA2386 isolated from white kimchi seuk. *Food Science and Biotechnology* 9:263-269

## I

- Ibrahim HR, Higashiguchi S, Sugimoto Y, Aoki T (1997)** Role of divalent cations in the novel bactericidal activity of the partially unfolded lysozyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45:89-94
- Ibrahim HR, Matsuzaki T, Aoki T (2001a)** Genetic evidence that antibacterial activity of lysozyme is independent of its catalytic function. *Febs Letters* 506:27-32

- Ibrahim HR, Thomas U, Pellegrini A (2001b)** A helix-loop-helix peptide at the upper lip of the active site cleft of lysozyme confers potent antimicrobial activity with membrane permeabilization action. *Journal of Biological Chemistry* 276:43767-43774
- Ihalin R, Loimaranta V, Lenander-Lumikari M, Tenovuo J (2001)** The sensitivity of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* to different (pseudo)halide-peroxidase combinations compared with mutans streptococci. *Journal of Medical Microbiology* 50:42-48
- Ihalin R, Loimaranta V, Tenovuo J (2006)** Origin, structure, and biological activities of peroxidases in human saliva. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 445:261-268
- Ihalin R, Nuutila J, Loimaranta V, Lenander M, Tenovuo J, Lilius EM (2003)** Susceptibility of *Fusobacterium nucleatum* to killing by peroxidase-iodide-hydrogen peroxide combination in buffer solution and in human whole saliva. *Anaerobe* 9:23-30
- Imlay JA (2003)** Pathways of oxidative damage. *Annual Review of Microbiology* 57:395-418
- INSERM (1999) maladies parodontales : thérapeutique et prévention. Expertise Collective INSERM, Les Editions INSERM, Paris
- Iontcheva I, Oppenheim FG, Troxler RF (1997)** Humans salivary mucin MG1 selectively forms heterotypic complexes with amylase, proline-rich proteins, statherin, and histatins. *Journal of Dental Research* 76:734-743
- Ito T, Komiya-Ito A, Arataki T, Furuya Y, Yajima Y, Yamada S, Okuda K, Kato T (2008)** Relationship between antimicrobial protein levels in whole saliva and periodontitis. *Journal of Periodontology* 79:316-322

## J

- Jack RW, Tagg JR, Ray B (1995)** Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiological reviews* 59:171-200
- Jenkins DE, Schultz JE, Matin A (1988)** Starvation-induced cross protection against heat or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> challenge in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 170:3910-3914
- Jensen ME, Polansky PJ, Schachtele CF (1982)** Plaque sampling and telemetry for monitoring acid production on human buccal tooth surfaces. *Archives of Oral Biology* 27:21-31
- Jenzano JW, Hogan SL, Noyes CM, Featherstone GL, Lundblad RL (1986)** Comparison of five techniques for the determination of protein content in mixed human saliva. *Analytical Biochemistry* 159:370-376
- Jishage M, Kvint K, Shingler V, Nystrom T (2002)** Regulation of sigma factor competition by the alarmone ppGpp. *Genes & Development* 16:1260-1270

## K

- Kaci G, Lakhdari O, Dore J, Ehrlich SD, Renault P, Blottiere HM, Delorme C (2011)** Inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway in human intestinal epithelial cells by commensal *Streptococcus salivarius*. *Applied and Environmental Microbiology* 77:4681-4684

- Kazor CE, Mitchell PM, Lee AM, Stokes LN, Loesche WJ, Dewhirst FE, Paster BJ (2003)** Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients. *Journal of Clinical Microbiology* 41:558-563
- Kelly GS (2007)** Body temperature variability (Part 2): masking influences of body temperature variability and a review of body temperature variability in disease. *Alternative Medicine Review* 12:49-62
- Kilian M, Nyvad B (1990)** Ability to bind salivary alpha-amylase discriminates certain viridans group streptococcal species. *Journal of Clinical Microbiology* 28:2576-2577
- Kim WS, Park JH, Ren J, Su P, Dunn NW (2001)** Survival response and rearrangement of plasmid DNA of *Lactococcus lactis* during long-term starvation. *Applied and Environmental Microbiology* 67:4594-4602
- Koh D, Yang Y, Khoo L, Nyunt SZ, Ng V, Goh CL (2004)** Salivary immunoglobulin A and lysozyme in patients with psoriasis. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore* 33:307-310
- Kolter R, Siegele DA, Tormo A (1993)** The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annual Review of Microbiology* 47:855-874
- Konings WN (2006)** Microbial transport: Adaptations to natural environments. *Antonie van Leeuwenhoek* 90:325-342
- Konings WN, Lolkema JS, Bolhuis H, Van Veen HW, Poolman B, Driessen AJM (1997)** The role of transport processes in survival of lactic acid bacteria, Energy transduction and multidrug resistance. *Antonie van Leeuwenhoek* 71:117-128
- Konings WN, Otto R (1983)** Energy transduction and solute transport in streptococci. *Antonie van Leeuwenhoek* 49:247-257
- Korpela A, Yu X, Loimaranta V, Lenander-Lumikari M, Vacca-Smith A, Wunder D, Bowen WH, Tenovuo J (2002)** Lactoperoxidase inhibits glucosyltransferases from *Streptococcus mutans* in vitro. *Caries Research* 36:116-121
- Krasse BO (1954)** The proportional distribution of *Streptococcus salivarius* and other streptococci in various parts of the mouth. *Odontologisk revy* 5:203-211
- Kubota H, Senda S, Nomura N, Tokuda H, Uchiyama H (2008)** Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 106:381-386
- Kunji ERS, Ubbink T, Matin A, Poolman B, Konings WN (1993)** Physiological-responses of *Lactococcus lactis* M13 to alternating conditions of growth and starvation. *Archives of Microbiology* 159:372-379

## L

- Lahteenmaki MT, Salo MS, Tenovuo JO, Helminen AV, Vilja PJ, Huupponen RK (2000)** The effects of glycopyrrolate on oral mucous host defenses in healthy volunteers. *Anesthesia and Analgesia* 91:467-472
- Laible NJ, Germaine GR (1982)** Adsorption of lysozyme from human whole saliva by *Streptococcus sanguis* 903 and other oral microorganisms. *Infection and Immunity* 36:148-159



- Larsen MJ, Jensen AF, Madsen DM, Pearce EI (1999)** Individual variations of pH, buffer capacity, and concentrations of calcium and phosphate in unstimulated whole saliva. *Archives of Oral Biology* 44:111-117
- Lee JY, Chung JW, K KY, Chung SC, Kho HS (2007)** Comparison of the composition of oral mucosal residual saliva with whole saliva. *Oral Diseases* 13:550-554
- Leibovitz A, Plotnikov G, Habot B, Rosenberg M, Wolf A, Nagler R, Graf E, Segal R (2003)** Saliva secretion and oral flora in prolonged nasogastric tube-fed elderly patients. *The Israel Medical Association journal* 5:329-332
- Leke N, Grenier D, Goldner M, Mayrand D (1999)** Effects of hydrogen peroxide on growth and selected properties of *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiology Letters* 174:347-353
- Lemos JA, Lin VK, Nascimento MM, Abranches J, Burne RA (2007)** Three gene products govern (p)ppGpp production by *Streptococcus mutans*. *Molecular Microbiology* 65:1568-1581
- Lemos JA, Nascimento MM, Lin VK, Abranches J, Burne RA (2008)** Global regulation by (p)ppGpp and codY in *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology* 190:5291-5299
- Lemos JAC, Abranches J, Burne RA (2005)** Responses of cariogenic streptococci to environmental stresses. *Current Issues in Molecular Biology* 7:95-107
- Lenander-Lumikari M, Mansson-Rahemtulla B, Rahemtulla F (1992)** Lysozyme enhances the inhibitory effects of the peroxidase system on glucose metabolism of *Streptococcus mutans*. *Journal of Dental Research* 71:484-490
- Leonard BAB, Woischnik M, Podbielski A (1998)** Production of stabilized virulence factor-negative variants by group A streptococci during stationary phase. *Infection and Immunity* 66:3841-3847
- Lessard C, Cochu A, Lemay JD, Roy D, Vaillancourt K, Frenette M, Moineau S, Vadeboncoeur C (2003)** Phosphorylation of *Streptococcus salivarius* lactose permease (LacS) by HPr(His~P) and HPr(Ser-P)(His~P) and effects on growth. *Journal of Bacteriology* 185:6764-6772
- 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
- Levesque C, Vadeboncoeur C, Frenette M (2004)** The csp operon of *Streptococcus salivarius* encodes two predicted cell-surface proteins, one of which, cspB, is associated with the fimbriae. *Microbiology* 150:189-198
- Levine MJ (1993a)** Development of artificial salivas. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 4:279-286
- Levine MJ (1993b)** Salivary macromolecules. *Annals of the New York Academy of Sciences* 694:11-16
- Levine MJ, Herzberg MC, Levine MS, Ellison SA, Stinson MW, Li HC, Van Dyke T (1978)** Specificity of salivary-bacterial interactions: role of terminal sialic acid residues in the interaction of salivary glycoproteins with *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus mutans*. *Infection and Immunity* 19:107-115
- Li YH, Chen YM, Burne RA (2000)** Regulation of urease gene expression by *Streptococcus salivarius* growing in biofilms. *Environmental Microbiology* 2:169-177
- Lida-Kondo C, Yoshino N, Kurabayashi T, Mataka S, Hasegawa M, Kurosaki N (2006)** Comparison of tongue volume/oral cavity volume ratio between obstructive sleep apnea

syndrome patients and normal adults using magnetic resonance imaging. *Journal of Medical and Dental Sciences* 53:119-126

**Liljemark WF, Bloomquist C (1996)** Human oral microbial ecology and dental caries and periodontal diseases. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 7:180-198

**Lorca GL, de Valdez GF (2001)** A low-pH-inducible, stationary-phase acid tolerance response in *Lactobacillus acidophilus* CRL 639. *Current Microbiology* 42:21-25

## M

**Majcherczyk PA, Langen H, Heumann D, Fountoulakis M, Glauser MP, Moreillon P (1999)** Digestion of *Streptococcus pneumoniae* cell walls with its major peptidoglycan hydrolase releases branched stem peptides carrying proinflammatory activity. *Journal of Biological Chemistry* 274:12537-12543

**Mandel ID (1987)** The functions of saliva. *Journal of Dental Research* 66:spec No: 623-627

**Mansson-Rahemtulla B, Pruitt KM, Tenovuo J, Le TM (1983)** A Mouthrinse which optimizes *in vivo* generation of hypothiocyanite. *Journal of Dental Research* 62:1062-1066

**Marouga R, Kjelleberg S (1996)** Synthesis of immediate upshift (Iup) proteins during recovery of marine *Vibrio* sp. strain S14 subjected to long-term carbon starvation. *Journal of Bacteriology* 178:817-822

**Marsh PD (1995)** The role of continuous culture in modelling the human microflora. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 64:1-9

**Marsh PD, Martin MV (2009)** *Oral Microbiology*, vol fifth Edition. Elsevier, London, UK

**Masschalck B, Michiels CW (2003)** Antimicrobial properties of lysozyme in relation to foodborne vegetative bacteria. *Critical Reviews in Microbiology* 29:191-214

**Mattingly SJ (1977)** Recovery of *Streptococcus mutans* after amino acid deprivation. *Infection and Immunity* 17:586-590

**McBain AJ (2009)** *In vitro* biofilm models: an overview. In: I. LA, Gadd GM, Sariaslani S (eds) *Advances in Applied Microbiology*, vol 69. Academic press, New York and London, pp 99-132

**McBain AJ, Bartolo RG, Catrenich CE, Charbonneau D, Ledder RG, Gilbert P (2003)** Effects of triclosan-containing rinse on the dynamics and antimicrobial susceptibility of *in vitro* plaque ecosystems. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47:3531-3538

**McBain AJ, Sissons C, Ledder RG, Sreenivasan PK, De Vizio W, Gilbert P (2005)** Development and characterization of a simple perfused oral microcosm. *Journal of Applied Microbiology* 98:624-634

**McCord JM, Keele BB, Jr., Fridovich I (1971)** An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68:1024-1027

**McDermid AS, McKee AS, Marsh PD (1987)** A mixed-culture chemostat system to predict the effect of anti-microbial agents on the oral flora: preliminary studies using chlorhexidine. *Journal of Dental Research* 66:1315-1320

**McDougald D, Rice SA, Weichart D, Kjelleberg S (1998)** Nonculturability: adaptation or debilitation? *FEMS Microbiology Ecology* 25:1-9

- McKee AS, McDermid AS, Ellwood DC, Marsh PD (1985)** The establishment of reproducible, complex communities of oral bacteria in the chemostat using defined inocula. *Journal of Applied Microbiology* 59:263-275
- Mercade M, Duperray F, Loubière P (2003)** Transient self-inhibition of the growth of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in a pH-regulated fermentor. *Biotechnology and Bioengineering* 84:78-87
- Merritt J, Niu G, Okinaga T, Qi F (2009)** Autoaggregation response of *Fusobacterium nucleatum*. *Applied and Environmental Microbiology* 75:7725-7733
- Mickelson MN (1977)** Glucose transport in *Streptococcus agalactiae* and its inhibition by lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide. *Journal of Bacteriology* 132:541-548
- Mickelson MN (1979)** Antibacterial action of lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide on *Streptococcus agalactiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 38:821-826
- Modi S, Behere DV, Samaresh M (1991)** Horseradish peroxidase catalyzed oxidation of thiocyanate by hydrogen peroxide: comparison with lactoperoxidase-catalysed oxidation and role of distal histidine. *Biochimica et Biophysica Acta* 1080:45-50
- Monoi N, Ohta H, Morishima S, Ochiai Y (2004)** Development of *in vitro* biofilm model : artificial food supplementation in chemostat-type system. *Journal of Oral Biosciences* 46:27-36
- Morris JG** Oxygen and growth of the oral bacteria. In: Kleinberg I, Ellison SA, Mandel ID (eds) *Saliva and Dental Caries*, New York, 1979. Information Retrieval Inc., pp 293-306
- Mostefaoui Y, Bart C, Frenette M, Rouabhia M (2004)** *Candida albicans* and *Streptococcus salivarius* modulate IL-6, IL-8, and TNF-alpha expression and secretion by engineered human oral mucosa cells. *Cellular Microbiology* 6:1085-1096
- Murakami H, Sly WS (1987)** Purification and characterization of human salivary carbonic anhydrase. *Journal of Biological Chemistry* 262:1382-1388

## N

- Nahir AM, Szargel R, Scharf J, Ben-Aryeh H, Laufer D, Scharf Y (1987)** Chemical analysis of whole saliva in Sjogren's syndrome. *Annals of the Rheumatic Diseases* 46:654-657
- Naim F, Messier S, Saucier L, Piette G (2004)** Postprocessing *in vitro* digestion challenge to evaluate survival of *Escherichia coli* O157:H7 in fermented dry sausages. *Applied and Environmental Microbiology* 70:6637-6642
- Nannen NL, Hutkins RW (1991)** Intracellular pH effects in lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science* 74:741-746
- Nash JA, Ballard TNS, Weaver TE, Akinbi HT (2006)** The peptidoglycan-degrading property of lysozyme is not required for bactericidal activity *in vivo*. *Journal of Immunology* 177:519-526
- Nobbs AH, Lamont RJ, Jenkinson HF (2009)** *Streptococcus* adherence and colonization. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 73:407-450

## O

**Odman ML (2005)** Influence de l'alimentation dans l'émergence de la lithiase salivaire. Université de Genève, Genève

**Okahashi N, Nakata M, Terao Y, Isoda R, Sakurai A, Sumitomo T, Yamaguchi M, Kimura RK, Oiki E, Kawabata S, Ooshima T (2011)** Pili of oral *Streptococcus sanguinis* bind to salivary amylase and promote the biofilm formation. *Microbial Pathogenesis* 50:148-154

## P

**Pandey A, Bringel F, Meyer JM (1994)** Iron requirement and search for siderophores in lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 40:735-739

**Parente E, Ciocia F, Ricciardi A, Zotta T, Felis GE, Torriani S (2010)** Diversity of stress tolerance in *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus paraplantarum*: A multivariate screening study. *International Journal of Food Microbiology* 144:270-279

**Parente E, Ricciardi A (1999)** Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 52:628-638

**Parret J, Bobillon G, Lissac M (1982)** Milieu buccal : Stomatologie. In: *Encyclopédie Médico Chirurgicale*, vol A10. Paris, France, p 22008

**Patel JR, Nou X (2008)** Effect of a reactive oxygen species-generating system for control of airborne microorganisms in a meat-processing environment. *Journal of Food Protection* 71:1922-1925

**Periasamy S, Chalmers NI, Du-Thumm L, Kolenbrander PE (2009)** *Fusobacterium nucleatum* ATCC 10953 requires *Actinomyces naeslundii* ATCC 43146 for growth on saliva in a three-species community that includes *Streptococcus oralis* 34. *Applied and Environmental Microbiology* 75:3250-3257

**Peters AC, Wimpenny JWT (1988)** A constant-depth laboratory model film fermentor. *Biotechnology and Bioengineering* 32:263-270

**Piard JC, Desmazeaud M (1991)** Inhibiting factors produced by lactic-acid bacteria .1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait* 71:525-541

**Pigman W, Elliott HC, Laffre RO (1952)** An artificial mouth for caries research. *Journal of Dental Research* 31:627-633

**Poolman B, Smid EJ, Veldkamp H, Konings WN (1987)** Bioenergetic consequences of lactose starvation for continuously cultured *Streptococcus cremoris*. *Journal of Bacteriology* 169:1460-1468

**Postma PW, Lengeler JW, Jacobson GR (1993)** Phosphoenolpyruvate - carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiological Reviews* 57:543-594

**Power D, Burton J, Chilcott C, Dawes P, Tagg J (2008)** Preliminary investigations of the colonisation of upper respiratory tract tissues of infants using a paediatric formulation of the oral probiotic *Streptococcus salivarius* K12. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 27:1261-1263

**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. *Journal of Clinical Microbiology* 36:41-47

**Pratten J, Pasu M, Jackson G, Flanagan A, Wilson M (2003)** Modelling oral malodour in a longitudinal study. *Archives of Oral Biology* 48:737-743

**Pratten J, Smith AW, Wilson M (1998a)** Response of single species biofilms and microcosm dental plaques to pulsing with chlorhexidine. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 42:453-459

**Pratten J, Wills K, Barnett P, Wilson M (1998b)** *In vitro* studies of the effect of antiseptic-containing mouthwashes on the formation and viability of *Streptococcus sanguis* biofilms. *Journal of Applied Microbiology* 84:1149-1155

**Pratten J, Wilson M (1999)** Antimicrobial susceptibility and composition of microcosm dental plaques supplemented with sucrose. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43:1595-1599

**Prescott LM, Harley JP, Klein DA (2003)** *Microbiologie*. De Boeck, Bruxelles

**Pruitt KM, Tenovuo J, Fleming W, Adamson M (1982)** Limiting factors for the generation of hypothiocyanite ion, an antimicrobial agent, in human saliva. *Caries Research* 16:315-323

## Q

**Quivey RG, Kuhnert WL, Hahn K (2000)** Adaptation of oral streptococci to low pH. *Advances in Microbial Physiology* 42:239-274

## R

**Rantonen P (2003)** Salivary flow and composition in healthy and diseased adults. University of Helsinki, Helsinki, Finlande

**Rault A, Béal C, Ghorbal S, Ogier JC, Bouix M (2007)** Multiparametric flow cytometry allows rapid assessment and comparison of lactic acid bacteria viability after freezing and during frozen storage. *Cryobiology* 55:35-43

**Rault A, Bouix M, Béal C (2008)** Dynamic analysis of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1 physiological characteristics during fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81:559-570

**Rayment SA, Liu B, Soares RV, Offner GD, Oppenheim FG, Troxler RF (2001)** The effects of duration and intensity of stimulation on total protein and mucin concentrations in resting and stimulated whole saliva. *Journal of Dental Research* 80:1584-1587

**Redon E, Loubiere P, Cocaign-Bousquet M (2005a)** Role of mRNA stability during genome-wide adaptation of *Lactococcus lactis* to carbon starvation. *Journal of Biological Chemistry* 280:36380-36385

**Redon E, Loubiere P, Cocaign-Bousquet M (2005b)** Transcriptome analysis of the progressive adaptation of *Lactococcus lactis* to carbon starvation. *Journal of Bacteriology* 187:3589-3592

- Renye JAJ, Piggot PJ, Daneo-Moore L, Buttaro BA (2004)** Persistence of *Streptococcus mutans* in stationary-phase batch cultures and biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 70:6181-6187
- Roger P, Delettre J, Bouix M, Béal C (2011a)** Characterization of *Streptococcus salivarius* growth and maintenance in artificial saliva. *Journal of Applied Microbiology* 111:631-641
- Roger P, Harn-Arsa S, Delettre J, Béal C (2011b)** Salivary enzymes and exhaled air affect *Streptococcus salivarius* growth and physiological state in complemented artificial saliva. *Archives of Microbiology*:1-6
- Rosch JW, Hsu FF, Caparon MG (2007)** Anionic lipids enriched at the export of *Streptococcus pyogenes*. *Journal of Bacteriology* 189:801-806
- Ross KF, Ronson CW, Tagg JR (1993)** Isolation and characterization of the lantibiotic salivaricin A and its structural gene *salA* from *Streptococcus salivarius* 20P3. *Applied and Environmental Microbiology* 59:2014-2021
- Rouillard JM, Zuker M, Gulari E (2003)** OligoArray 2.0: design of oligonucleotide probes for DNA microarrays using a thermodynamic approach. *Nucleic Acids Research* 31:3057-3062
- Russell C, Melville TH (1978)** Bacteria in the human mouth. *Journal of Applied Microbiology* 44:163-181
- Russell RRB (2010)** Bacterial polysaccharides in dental plaque. In: Ullruch M (ed) *Bacterial polysaccharides*. Academic Press, Norfolk, UK, pp 143-156

## S

- Samot J, Lebreton J, Badet C (2011)** Adherence capacities of oral lactobacilli for potential probiotic purposes. *Anaerobe* 17:69-72
- Sanders JW, Venema G, Kok J (1999)** Environmental stress responses in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiology Reviews* 23:483-501
- Saunders KA, Greenman J, McKenzie C (2000)** Ecological effects of triclosan and triclosan monophosphate on defined mixed cultures of oral species grown in continuous culture. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 45:447-452
- Scannapieco FA, Bergey EJ, Reddy MS, Levine MJ (1989)** Characterization of salivary alpha-amylase binding to *Streptococcus sanguis*. *Infection and Immunity* 57:2853-2863
- Schachtele CF, Nobbs A, Zhang Y, Costalonga M, Herzberg MC (2007)** Oral streptococci : commensals and opportunistic pathogens. In: Hakenbeck R, Chhatwal S (eds) *Molecular biology of Streptococci*. Horizon bioscience, Whimondham, UK,
- Schepers AW, Thibault J, Lacroix C (2002)** *Lactobacillus helveticus* growth and lactic acid production during pH-controlled batch cultures in whey permeate/yeast extract medium. Part I. multiple factor kinetic analysis. *Enzyme and Microbial Technology* 30:176-186
- Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T (2006)** The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology* 7:3

- Shatzman AR, Henkin RI (1981)** Gustin concentration changes relative to salivary zinc and taste in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78:3867–3871
- Shelburne SA, Sumby P, Sitkiewicz I, Granville C, DeLeo FR, Musser JM (2005)** Central role of a bacterial two-component gene regulatory system of previously unknown function in pathogen persistence in human saliva. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:16037-16042
- Shellis RP (1978)** A synthetic saliva for cultural studies of dental plaque. *Archives of Oral Biology* 23:485-489
- Shellis RP, Duckworth RM (1994)** Studies on the cariostatic mechanisms of fluoride. *International Dental Journal* 44:263-273
- Shimamoto T, Fukui K, Kodama T, Shimono T, Ohta H, Kato K (1990)** Effects of oxygen on growth of *Streptococcus mutans*. *Shika Kiso Igakkai Zasshi* 32:10-19
- Siegumfeldt H, Rechinger KB, Jakobsen M (2000)** Dynamic changes of intracellular pH in individual lactic acid bacterium cells in response to a rapid drop in extracellular pH. *Applied and Environmental Microbiology* 66:2330-2335
- Sissons CH (1997)** Artificial dental plaque biofilm model systems. *Advances in Dental Research* 11:110-126
- Sissons CH, Anderson SA, Wong L, Coleman MJ, White DC (2007)** Microbiota of plaque microcosm biofilms: effect of three times daily sucrose pulses in different simulated oral environments. *Caries research* 41:413-422
- Sissons CH, Cutress TW, Hoffman MP, Wakefield JSJ (1991)** A multi-station dental plaque microcosm (artificial mouth) for the study of plaque growth, metabolism, pH, and mineralization. *Journal of Dental Research* 70:1409-1416
- Sissons CH, Hancock EM (1993)** Urease activity in *Streptococcus salivarius* at low pH. *Archives of Oral Biology* 38:507-516
- Sissons CH, Loong PC, Hancock EM, Cutress TW (1989)** Electrophoretic analysis of ureases in *Streptococcus Salivarius* and in saliva. *Oral Microbiology and Immunology* 4:211-218
- Sissons CH, Perinpanayagam HER, Hancock EM, Cutress TW (1990)** pH regulation of urease levels in *Streptococcus salivarius*. *Journal of Dental Research* 69:1131-1137
- Socransky SS, Manganiello SD (1971)** The oral microbiota of man from birth to senility. *Journal of Periodontology* 42:485-496
- Soularue P, Gidrol X (2002)** puces à ADN. *Les Techniques de l'Ingénieur*:1-10
- Steiner K, Malke H (2001)** *relA*-independent amino acid starvation response network of *Streptococcus pyogenes*. *Journal of Bacteriology* 183:7354-7364
- Sterer N, Rosenberg M (2006)** *Streptococcus salivarius* promotes mucin putrefaction and malodor production by *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Dental Research* 85:910-914
- Sund-Levander M, Forsberg C, Wahren LK (2002)** Normal oral, rectal, tympanic and axillary body temperature in adult men and women: a systematic literature review. *Scandinavian Journal of Caring Sciences* 16:122-128
- Svensater G, Sjogreen B, Hamilton IR (2000)** Multiple stress responses in *Streptococcus mutans* and the induction of general and stress-specific proteins. *Microbiology* 146:107-117

## T

- Tabak LA (1995)** In defense of the oral cavity: structure, biosynthesis, and function of salivary mucins. *Annual Review of Physiology* 57:547-564
- Tabak LA, Bowen WH (1989)** Roles of saliva (pellicle), diet, and nutrition on plaque-formation. *Journal of Dental Research* 68:1560-1566
- Tabak LA, Levine MJ, Mandel ID, Ellison SA (1982)** Role of salivary mucins in the protection of the oral cavity. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 11:1-17
- Tagg JR (2004)** Prevention of streptococcal pharyngitis by anti-*Streptococcus pyogenes* bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Streptococcus salivarius*. *The Indian Journal of Medical Research* 119 13-16
- Tagg JR, Chilcott CN, Burton JP (2009)** Treatment of malodour. United States Patent US 7595041 B2
- Tagg JR, Dierksen KP, Upton M (2004)** Lantibiotic. United States Patent
- Tappuni AR, Challacombe SJ (1993)** Distribution and isolation frequency of eight streptococcal species in saliva from predentate and dentate children and adults. *Journal of Dental Research* 72:31-36
- Ten Brink B, Otto R, Hansen UP, Konings WN (1985)** Energy recycling by lactate efflux in growing and nongrowing cells of *Streptococcus cremoris*. *Journal of Bacteriology* 162:383-390
- Tenovuo J (2004)** Protective function of saliva. In: Edgar WM, dawes C, O'Mullane DM (eds) *Saliva and oral health*. 3 edn. British dental association, London, UK, pp 103-119
- Tenovuo J, Grahn E, Lehtonen OP, Hyyppa T, Karhuvaara L, Vilja P (1987)** Antimicrobial factors in saliva: ontogeny and relation to oral health. *Journal of Dental Research* 66:475-479
- Tenovuo J, Mäkinen KK (1976)** Concentration of thiocyanate and ionizable iodine in saliva of smokers and nonsmokers. *Journal of Dental Research* 55:661-663
- Thatcher BJ, Doherty AE, Orvisky E, Martin BM, Henkin RI (1998)** Gustin from human parotid saliva is carbonic anhydrase VI. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 250:635-641
- Thibessard A, Fernandez A, Gintz B, Leblond-Bourget N, Decaris B (2001)** Hydrogen peroxide effects on *Streptococcus thermophilus* CNRZ368 cell viability. *Research in Microbiology* 152:593-596
- Thomas EL, Milligan TW, Joyner RE, Jefferson MM (1994)** Antibacterial activity of hydrogen peroxide and the lactoperoxidase-hydrogen peroxide-thiocyanate system against oral streptococci. *Infection and Immunity* 62:529-535
- Thomas EL, Pera KA, Smith KW, Chwang AK (1983)** Inhibition of *Streptococcus mutans* by the lactoperoxidase antimicrobial system. *Infection and Immunity* 39:767-778
- Townsend-Lawman P, Bleiweis AS (1991)** Multilevel control of extracellular sucrose metabolism in *Streptococcus salivarius* by sucrose. *Journal of General Microbiology* 137:5-13
- Trainor VC, Udy RK, Bremer PJ, Cook GM (1999)** Survival of *Streptococcus pyogenes* under stress and starvation. *FEMS Microbiology Letters* 176:421-428
- Trmcic A (2011)** Détection et étude de l'expression de gènes de bactériocines de bactéries lactiques dans les fromages. AgroParisTech-University of Ljubljana, Paris, Ljubljana, Slovenia



**Turner NC, Crowell GE (1947)** Dental caries and tryptophane deficiency. *Journal of Dental Research* 26:99-104

## U

**Upton M, Tagg JR, Wescombe P, Jenkinson HF (2001)** Intra- and interspecies signaling between *Streptococcus salivarius* and *Streptococcus pyogenes* mediated by SalA and SalA1 lantibiotic peptides. *Journal of Bacteriology* 183:3931-3938

## V

**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

**Valimaa H, Waris M, Hukkanen V, Blankenvoorde MFJ, Nieuw Amerongen AV, Tenovuo J (2002)** Salivary defense factors in herpes simplex virus infection. *Journal of Dental Research* 81:416-421

**Van de Guchte M, Serror P, Chervaux C, Smokvina T, Ehrlich S, Maguin E (2002)** Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 82:187-216

**Van der Hoeven JS, Camp PJ (1991)** Synergistic degradation of mucin by *Streptococcus oralis* and *Streptococcus sanguis* in mixed chemostat cultures. *Journal of Dental Research* 70:1041-1044

**Van Houte J, Gibbons RJ, Banghart SB (1970)** Adherence as a determinant of the presence of *Streptococcus salivarius* and *Streptococcus sanguis* on the human tooth surface. *Archives of Oral Biology* 15:1025-1034

**Vera Pingitore E, Hebert EM, Sesma F, Nader-Macias ME (2009)** Influence of vitamins and osmolites on growth and bacteriocin production by *Lactobacillus salivarius* CRL 1328 in a chemically defined medium. *Canadian Journal of Microbiology* 55:304-310

## W

**Wang JG, Mahmud SA, Nguyen J, Slungaard A (2006)** Thiocyanate-dependent induction of endothelial cell adhesion molecule expression by phagocyte peroxidases: A novel HOSCN-specific oxidant mechanism to amplify inflammation. *The Journal of Immunology* 177:8714-8722

- Wang Y, Delettre J, Corrieu G, Béal C (2011)** Starvation induces physiological changes that act on the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus* RD758. *Biotechnology Progress* 27:342-350
- Wang Y, Delettre J, Guillot A, Corrieu G, Béal C (2005)** Influence of cooling temperature and duration on cold adaptation of *Lactobacillus acidophilus* RD758. *Cryobiology* 50:294-307
- Wang YB, Germaine GR (1993)** Effects of pH, potassium, magnesium, and bacterial growth phase on lysozyme inhibition of glucose fermentation by *Streptococcus mutans* 10449. *Journal of Dental Research* 72:907-911
- Weaver CA, Chen YYM, Burne RA (2000)** Inactivation of the ptsI gene encoding enzyme I of the sugar phosphotransferase system of *Streptococcus salivarius*: effects on growth and urease expression. *Microbiology* 146:1179-1185
- Webb M (1951)** The Influence of magnesium on cell division 5. The effect of magnesium on the growth of bacteria in chemically -defined media of varying complexity. *Journal of General Microbiology* 5:485-495
- Webb M (1953)** Effects of magnesium on cellular division in bacteria. *Science* 118:607-611
- Weerkamp AH, McBride BC (1980)** Adherence of *Streptococcus salivarius* HB and HB-7 to oral surfaces and saliva-coated hydroxyapatite. *Infection and immunity* 30:150-158
- Weerkamp AH, Van der Mei HC, Liem RS (1986)** Structural properties of fibrillar proteins isolated from the cell surface and cytoplasm of *Streptococcus salivarius* (K+) cells and nonadhesive mutants. *Journal of Bacteriology* 165:756-762
- Weerkamp AH, Van der Mei HC, Slot JW (1987)** Relationship of cell surface morphology and composition of *Streptococcus salivarius* K+ to adherence and hydrophobicity. *Infection and Immunity* 55:438-445
- Wescombe P, Burton J, Cadieux P, Klesse N, Hyink O, Heng NCK, Chilcott C, Reid G, Tagg J (2006a)** Megaplasms encode differing combinations of lantibiotics in *Streptococcus salivarius*. *Antonie van Leeuwenhoek* 90:269-280
- Wescombe PA, Heng NCK, Burton JP, Chilcott CN, Tagg JR (2009)** Streptococcal bacteriocins and the case for *Streptococcus salivarius* as model oral probiotics. *Future Microbiology* 4:819-835
- Wescombe PA, Upton M, Dierksen KP, Ragland NL, Sivabalan S, Wirawan RE, Inglis MA, Moore CJ, Walker GV, Chilcott CN, Jenkinson HF, Tagg JR (2006b)** Production of the lantibiotic salivaricin A and its variants by oral streptococci and use of a specific induction assay to detect their presence in human saliva. *Applied and Environmental Microbiology* 72:1459-1466
- Wescombe PA, Upton M, Renault P, Wirawan RE, Power D, Burton JP, Chilcott CN, Tagg JR (2011)** Salivaricin 9, a new lantibiotic produced by *Streptococcus salivarius*. *Microbiology* 157:1290-1299
- Whelton H (2004)** Introduction : the anatomy and physiology of salivary glands. In: Edgar WM, dawes C, O'Mullane DM (eds) *Saliva and oral health*. 3 edn. British dental association, London, UK, pp 1-13
- Whittaker CJ, Klier CM, Kolenbrander PE (1996)** Mechanisms of adhesion by oral bacteria. *Annual Review of Microbiology* 50:513-552
- Wilkinson JF (1963)** Carbon and energy storage in bacteria. *Journal of General Microbiology* 32:171-176

**Williams CJ, Kraus FW (1963)** Sterilization and storage of saliva. *Journal of Dental Research* 42:1416-1428

**Wilson BM (1999)** Use of constant depth film fermentor in studies of biofilms of oral bacteria. *Methods in Enzymology* 310:264-279

**Wilson WA, Roach PJ, Montero M, Baroja-Fernández E, Muñoz FJ, Eydallin G, Viale AM, Pozueta-Romero J (2010)** Regulation of glycogen metabolism in yeast and bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 34:952-985

**Wong L, Sissons CH (2001)** A comparison of human dental plaque microcosm biofilms grown in an undefined medium and a chemically defined artificial saliva. *Archives of Oral Biology* 46:477-486

**Wyss C (1992)** Growth of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *T. pectinovorum*, *T. socranskii*, and *T. vincentii* in a chemically defined medium. *Journal of Clinical Microbiology* 30:2225-2229

## Z

**Zampatti O, Corpet D, Roques C, Michel G (1994)** Comparative *in vivo* and *in vitro* study of bacterial colonization by *Streptococcus mutans* on dental surfaces in axenic rats and in an artificial model of the oral cavity. *Pathologie-Biologie* 42:157-162

**Zanin ICJ, Goncalves RB, Junior AB, Hope CK, Pratten J (2005)** Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an *in vitro* study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56:324-330

**Zhu M, Takenaka S, Sato M, Hoshino E (2001)** Influence of starvation and biofilm formation on acid resistance of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiology and Immunology* 16:24-27

# Annexes

## Annexe 1 : Composition des milieux M17, mixte et CAS (complemented artificial saliva)

	M17 (g/L)	MM (g/L)	CAS (g/L)
<i>M17</i>	Tryptone	2,5	2,5
	Hydrolysate pepsique de viande	2,5	2,5
	Peptone papainique de soja	5,0	5,0
	Extrait de levure	2,5	2,5
	Extrait de viande	5,0	5,0
	Glycérophosphate de sodium	19,0	19,0
	Sulfate de magnésium	0,25	0,25
	Acide ascorbique	0,5	0,5
Lactose	5,0	5,0	
<i>Salive artificielle</i>	KCl		0,89
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		0,66
	MgCl <sub>2</sub>		0,08
	KHCO <sub>3</sub>		0,49
	NaNO <sub>3</sub>		0,37
	NH <sub>4</sub> Cl		0,59
	CaCO <sub>3</sub>		0,12
	Urée		0,20
	Mucine		2,00
<i>Solution repas</i>	Glucose		1,4
	Extrait de viande		5,0

## **Annexe 2 : Composition et fonctions du tampon de focalisation pour la première dimension de l'électrophorèse bidimensionnelle**

### **Tampon de base de focalisation**

Composés	Concentration	Fonctions
Urée (Sigma, Lyon)	7 M	Solubiliser et dénaturer les protéines en perturbant les liaisons hydrogènes et les structures secondaires des protéines, qui peuvent affecter leur mobilité
Thiourée (Sigma)	2 M	Même fonction que l'urée, mais pour les protéines membranaires de plus faible solubilité
Triton 100 (Sigma)	5 g/L	Perturber les interactions hydrophobes et augmenter la mobilité des protéines vers leur pI
BioLyte 4-6 (Biorad, Marnes-la-Coquette)	3 g/L	Contre la précipitation des protéines due à une quantité de sel insuffisante
BioLyte 5-7 (Biorad)	3 g/L	Même fonction que le BioLyte 4-6

### **Tampon de focalisation (pour 1 strip)**

1,1 mg de dithiothreitol (DTT, Biorad) sont pesés et puis dissous dans 0,35 mL de tampon de base de focalisation (concentration finale en DTT : 20 mM). La fonction du DTT est de perturber les liaisons disulfides et de permettre la séparation des sous-unités protéiques. Ce tampon est préparé juste avant son utilisation. Quelques grains de bleu de bromophénol sont ajoutés au tampon de focalisation afin de vérifier visuellement le bon déroulement de la migration.

**Annexe 3 : Programmes de focalisation et de migration pour la première et la deuxième dimension de l'électrophorèse bidimensionnelle**

**Programme de focalisation de 24 h 30 (1<sup>ère</sup> dimension)**

Etape	Voltage (volts)	Durée	
0	50	11 h	
1	50 à 500	30 min	
2	500	1 h	
3	500 à 1000	1 h	
4	1000	30 min	
5	1000 à 3000	1 h	
6	3000	30 min	
7	3000 à 8000	1 h 30 min	
8	8000	7 h 30 min	

**Programme de migration (2<sup>ème</sup> dimension)**

Etape	Durée	Intensité* pour 1 gel
Pré-migration	15 min	5 mA
Migration	16 h 30 min	10 mA

\*L'intensité est multipliée par le nombre de gels migrant simultanément

#### **Annexe 4 : Composition des tampons d'équilibration**

##### **Tampon de base d'équilibration**

Composés	Concentration finale
Urée (Sigma, Lyon)	6 M
SDS 20 % (Biorad, Marnes-la-Coquette)	20 g/L
Tris HCl 1,5 M pH 8,8 (Sigma)	0,375 M
Glycérol (VWR, Strasbourg)	200 g/L
Eau milliQ	qsp
Bleu de Coomassie (Biorad)	traces

##### **Tampon d'équilibration E1 (pour un strip)**

50 mg de dithiothreitol (DTT, Biorad) sont dissous dans 0,5 mL d'eau milliQ. 2 mL de tampon de base d'équilibration sont ajoutés pour atteindre une concentration finale en DTT de 130 mM. Ce tampon est préparé juste avant utilisation. Les strips sont incubés dans le tampon E1 pendant 15 min.

##### **Tampon d'équilibration E2 (pour un strip)**

100 mg d'iodoacétamide (Biorad) sont dissous dans 0,5 mL d'eau miliQ. 2 mL de tampon de base d'équilibration sont ajoutés pour atteindre une concentration finale en iodoacétamide de 210 mM. Ce tampon est préparé juste avant utilisation. Les strips sont incubés dans le tampon E2 pendant 20 min.

**Annexe 5 : Composition du gel d'acrylamide et du tampon de migration pour la deuxième dimension de l'électrophorèse bidimensionnelle**

**Gel d'acrylamide 12,5 % (composition pour un gel)**

Composés	Volumes
Acrylamide / Bis acrylamide (37,5 :1) (Biorad, Marnes-la-Coquette)	21 mL
Tampon Tris HCl 1,5 M pH 8,8 (Sigma, Lyon)	12,5 mL
SDS 20 % (Biorad)	0,25 mL
Eau milliQ	qsp 50 mL

**Préparation du gel**

250 µL de persulfate d'ammonium (APS) à 10 % (concentration finale de 0,5 %) et 16 µL de Temed (Biorad) sont ajoutés au mélange juste avant de le couler entre les plaques. Il convient d'attendre entre 1 à 2 heures pour garantir la complète polymérisation du gel avant utilisation.

**Composition du tampon de migration (concentration x 10)**

Composés	Concentration finale
Tampon Tris HCl 1,5 M pH 8,8 (Sigma, Lyon)	0,025 M
Glycine (Biorad, Marnes-la-Coquette)	0,182 M
SDS 20 % (Biorad)	0,1 %
Eau milliQ	qsp 1 L



## **Annexe 6 : Protocole de vérification de la qualité de l'ARN : migration sur gel d'agarose**

- ✓ La cuve de migration et le peigne doivent être nettoyés avec du NaOH 50mM pendant 30 min puis rincés abondamment à l'eau stérile
- ✓ Préparation du gel : agarose 2% dans le tampon de migration TAE 1X
  - tampon de migration TAE 50X

Composés	Concentration finale
Tris Base (Merck, Darmstadt, Allemagne)	242 g/L
Acide acétique glacial (Sigma, Lyon)	57,1 g/L
Titriplex III (EDTA) (Sigma)	100 mL/L

- Dissoudre 2 g d'agarose (Sigma) dans 100 mL de TAE 1X
- Faire chauffer au micro onde jusqu'à disparition de petit précipités
- Ajouter 1  $\mu$ L BET (Sigma)
- Monter la cuve et placer le peigne
- Couler le gel (100 mL pour 1 gel)
- Attendre 30 min que gel polymérise
- Retirer le peigne
- Mettre le gel dans la cuve
- Remplir la cuve de tampon TAE 1X
- ✓ Dans un tube Eppendorf, placer
  - 2  $\mu$ g d'ARN
  - 5  $\mu$ L H<sub>2</sub>O stérile
  - 1,5  $\mu$ L de bleu de chargement 1 x (Bleu de bromophénol 0,1%, xylène 0,1%, EDTA 100mM, ficoll 400 25% pour une solution mère de bleu de chargement 5x) Vortexer
- ✓ Déposer la totalité du mélange dans les puits
- ✓ Faire migrer pendant 99 min à 50 volts

## **Annexe 7 : Protocole de vérification de la qualité de l'ARN : test d'amplification de l'ADN résiduel par PCR**

- ✓ Solution mix à préparer à 4 °C (pour un échantillon d'ARN à tester)
  - 22,875 µL H<sub>2</sub>O
  - 5 µL de tampon 10x (Takara bio, Saint-Germain-en-Laye)
  - 2 µl de dNTP (Takara bio)
  - 5 µL de l'oligo 1 de l'espèce *S. salivarius* à 10µm (EG 1045, ATTGATTGACCGTGTGTAT)
  - 5 µL de l'oligo 2 de l'espèce *S. salivarius* à 10µm (EG 1046, ACTTACGAGAATGAATGTCA)
  - 0,125 µL de ex-Taq (Takara bio, ref RR001)
- ✓ Dans un tube à PCR, mettre 5 µg d'ARN ou 1 µL d'ADN chromosomique (témoin positif)
- ✓ Ajuster le volume à 10 µL par de l'eau stérile
- ✓ Ajouter 40 µL de mix
- ✓ Lancer la PCR selon le programme suivant :
  - 94 °C → 5 min
  - 94 °C → 30 sec
  - 50 °C → 30 sec
  - 72 °C → 1 min
  - 72 °C → 5 min
  - 4 °C → jusqu'à arrêt de la PCR

( 30 cycles )
- ✓ Préparation du gel : agarose 0,7% dans le tampon de migration TBE 0,5x
  - Dissoudre 0,7 g d'agarose (Sigma, Lyon) dans 100 mL de TBE 0,5X
  - Faire chauffer au micro-onde jusqu'à disparition des petits précipités
  - Ajouter 1,5 µL BET (Sigma)
  - Monter la cuve et place le peigne
  - Couler le gel (100 mL pour 1 gel)
  - Attendre 30 min que gel polymérise
  - Retirer le peigne
  - Mettre le gel dans la cuve
  - Remplir la cuve de tampon TBE 0,5X
  - Dans le tube PCR, ajouter 10 µL de bleu de chargement
  - Vortexer
- ✓ Déposer 20 µL du mélange dans les puits
- ✓ Déposer 4 µL de marqueur de poids moléculaire dans un puits
- ✓ Faire migrer à 110 volts et vérifier régulièrement l'état de migration

## Annexe 8 : Liste et caractéristiques des oligonucléotides utilisés pour les essais en Q-PCR

Numéro de l'oligonucléotide	Gène	Souche	Séquence de l'oligonucléotide	Taille	Taille du fragment amplifié	Tm* (°C)	% GC
SSAL-Q53	<i>ureI</i>	K12	TGCCTTCACCTACCTTTACTCA	22	210	58,90	45
SSAL-Q54	<i>ureI</i>	K12	CCAGATGTTAAGCAAAGAATCC	22	314	57,89	40
SSAL-Q55	<i>fabH</i>	K12	GACCGTACAACAGCTGCTCTCT	22	448	60,74	54
SSAL-Q56	<i>fabH</i>	K12	GACTCAAGACCACCCTTGCTAC	22	548	60,17	54
SSAL-Q57	<i>atpH</i>	K12	TACTCAATGACCGTGCCAACAT	22	245	62,60	45
SSAL-Q58	<i>atpH</i>	K12	TTGTTCCCTCAGACAAGGGACTT	22	345	60,15	45
SSAL-Q59	<i>comGB</i>	K12	ATGCTTCGTATGACCAAGGTTTC	22	127	60,38	45
SSAL-Q60	<i>comGB</i>	K12	ACCCTCTAACAGTTGCGGTAAA	22	234	60,06	45
SSAL-Q61	<i>clpE</i>	K12	GAGTTCGGCATTAAACATCACTG	22	340	59,64	45
SSAL-Q62	<i>clpE</i>	K12	TGAGGACGGGATTGTTCTTAGT	22	445	60,00	45
SSAL-Q63	<i>aroE</i>	K12	CGATGCCATATAAGGAAGCAGT	22	200	60,48	45
SSAL-Q64	<i>aroE</i>	K12	ACCGTCCGTATTATGACCAATC	22	303	59,97	45
SSAL-Q65	<i>murG</i>	K12	AGATTCGTCCTCAAGCACTCTT	22	281	59,53	45
SSAL-Q66	<i>murG</i>	K12	CCAAGCCCATAGAAAGATCAGA	22	379	60,57	45
SSAL-Q67	<i>epsI</i>	K12	GTTAGGTGAAGATGTCCGCTTT	22	546	59,66	45
SSAL-Q68	<i>epsI</i>	K12	TTAGGGTTATAGCCCGACATGG	22	653	62,18	50
SSAL-Q69	<i>malQ</i>	K12	GAAACTTCGCAAAGAACTTGCT	22	525	60,06	40
SSAL-Q70	<i>malQ</i>	K12	GTCACCGATGATTTGAATACCA	22	627	59,69	40
SSAL-Q71	<i>glgP</i>	K12	GTGTGGACTACGGTTTGATTGA	22	590	59,90	45
SSAL-Q72	<i>glgP</i>	K12	GGTAGATACGCAAGAGCTCACC	22	691	60,29	54
SSAL-Q73	<i>upp</i>	K12	ATCCCTTCCAACCTGGTAAGAC	22	221	60,59	50
SSAL-Q74	<i>upp</i>	K12	AGCCTCCATCCAGTCATCTAAA	22	324	60,10	45
SSAL-Q75	<i>htra</i>	K12	CGTATCTAGCCTTAGCCGTACC	22	645	60,46	54
SSAL-Q76	<i>htrA</i>	K12	TATTGACTAAGGCACCACCAGA	22	745	59,77	45
SSAL-Q77	<i>treB (scrA)</i>	K12	GTGTCACCACAATTGCTTAACG	22	592	60,46	45
SSAL-Q78	<i>treB (scrA)</i>	K12	TTGCGCTTGATAACCTATACGA	22	690	59,77	40
SSAL-Q79	<i>uvrB</i>	K12	GAAGTCGAGCACCTTGTTCTTT	22	739	59,93	45
SSAL-Q80	<i>uvrB</i>	K12	CTTACCCTCAGCTTCAAATTGC	22	846	60,26	45
SSAL-Q81	<i>argD</i>	K12	GGACTTGGTCGACTGGTAAGC	22	628	60,06	54
SSAL-Q82	<i>argD</i>	K12	AGAGATGACTTAGCAAGCATGG	22	731	58,63	45
SSAL-Q83	<i>mraY</i>	K12	AGATGTCCGGTTCCTTGCACTT	22	690	60,04	45
SSAL-Q84	<i>mraY</i>	K12	AGCATGACAGAAGCTGTCTCAA	22	788	60,20	45
SSAL-Q85	<i>dltB</i>	K12	GTTTGCCCTAGCAGCATCTAAC	22	765	60,28	50
SSAL-Q86	<i>dltB</i>	K12	GGAACCAGAAAGACAAGCTCAT	22	868	59,76	45
SSAL-Q87	<i>lacG</i>	K12	ATCCTAGCTGAGAATGGTGAG	22	796	59,74	50
SSAL-Q88	<i>lacG</i>	K12	AAGCTTGCATCCAATCACTCAT	22	898	61,02	40
SSAL-Q89	<i>citB</i>	K12	ATGATGGGCTCCTATATCCTGA	22	569	59,78	45
SSAL-Q90	<i>citB</i>	K12	TTCACCTAGCATAGCTGCTTCA	22	672	60,17	45
SSAL-Q91	<i>rmlC</i>	K12	CCTACAGCTACCTTGTAACGA	22	410	59,44	50
SSAL-Q92	<i>rmlC</i>	K12	TCTGAGACTTCTGCTTCTCCA	22	512	59,35	45
SSAL-Q93	<i>gtfD1</i>	K12	AACAACCTCAACCAGTTGCCTCT	22	132	60,21	45
SSAL-Q94	<i>gtfD1</i>	K12	GTATCAGCAGCCTTGTCAGTTG	22	239	59,94	50

SSAL-Q95	<i>gtfD2</i>	K12	AGGTCAAATGTACAAGGGTGGT	22	3648	59,66	45
SSAL-Q96	<i>gtfD2</i>	K12	GACCTTTAGCCATGACACCTTC	22	3748	60,00	50
SSAL-Q97	<i>gtfB</i>	K12	CTCTCAAGGCTCTTCACAAACA	22	2834	59,66	45
SSAL-Q98	<i>gtfB</i>	K12	AAGCACCTTACCATGCGTATCT	22	2937	60,00	45
SSAL-Q99	<i>pulA</i>	K12	TACTCATGGAGTCAAGGCAGAA	22	114	59,88	45
SSAL-Q100	<i>pulA</i>	K12	TCAGCTGTTAGAGGAGCTGTTG	22	221	59,82	50
SSAL-Q101	<i>fruA</i>	K12	GTCCTTGTTTCTGAATCTGCT	22	237	59,76	45
SSAL-Q102	<i>fruA</i>	K12	CTCCTTGCGCTTGGTTAGTTAC	22	340	60,31	50
SSAL-Q103	<i>pmi</i>	K12	GCGTCAGCAAATTGAAAGTAAG	22	417	59,08	40
SSAL-Q104	<i>pmi</i>	K12	TCAAGAACCATGATACCTGCAC	22	521	60,00	45
SSAL-Q105	<i>gtfD</i>	K12	CGTGAACAGCTACTACAGACC	22	454	60,00	54
SSAL-Q106	<i>gtfD</i>	K12	TTGGATACCAGTCGCTGTATTG	22	558	60,02	45
SSAL-Q107	<i>gtfD</i>	K12	AGTACGGTTCATTGGCTGACTT	22	2897	60,06	45
SSAL-Q108	<i>gtfD</i>	K12	TTGCTGTAACCACTTCATCACC	22	3001	60,04	45
SSAL-Q109	<i>rfaJ</i>	K12	AGTACACCGGGATTCAACATTC	22	782	60,12	45
SSAL-Q110	<i>rfaJ</i>	K12	TACCATAACAGGAGCAGCGATA	22	882	59,76	45
SSAL-Q111	<i>csbB</i>	K12	AGGTTTACTTGCAGGACTCGAA	22	237	60,29	45
SSAL-Q112	<i>csbB</i>	K12	CAACGTCGTAACCTTCTGGAT	22	340	60,40	45
SSAL-Q113	<i>gbpD(bglB)</i>	K12	AGACGCAACAGTACAACCAGAA	22	1023	59,84	45
SSAL-Q114	<i>gbpD(bglB)</i>	K12	CTCTGTCCAGGAAGATCAGTC	22	1128	60,25	54
SSAL-Q115	<i>gtfD</i>	K12	GGAAGTCTGCTAGCTCAAGGAA	22	94	60,15	50
SSAL-Q116	<i>gtfD</i>	K12	GCTTGCTCAGTAACAGTTGTGG	22	200	59,98	50
SSAL-Q117	<i>oatA</i>	K12	ATCTCTTGCTGCTTTATGGTG	22	510	60,63	45
SSAL-Q118	<i>oatA</i>	K12	AAAGAGCGAGCCTAGGAAGAAT	22	615	60,01	45
SSAL-Q119	<i>SalT</i>	K12	CTGCTGTTGGGAAATATGTCTT	22	305	58,26	40
SSAL-Q120	<i>SalT</i>	K12	GCCAACTAATCCTCGTTTACT	22	411	59,66	45
SSAL-Q121	<i>sboK</i>	K12	CGGATGAAAGGCGAGCTACTAT	22	486	61,89	50
SSAL-Q122	<i>sboK</i>	K12	GCGTCCTTGTTAAATGATTCTG	22	591	58,77	40
SSAL-Q123	<i>tuf</i>	K12	CCAGTTATCCAAGGTTGAGCTC	22	514	60,13	50
SSAL-Q124	<i>tuf</i>	K12	ATGGTTTGTGAGTGTACGTTTC	22	619	59,94	45
SSAL-Q133	<i>Rrf</i>	K12	TTGGTTATCCAGCACTTACAG	22	298	59,15	45
SSAL-Q134	<i>rrf</i>	K12	TAGCTTCATCCATAGCATCACG	22	397	60,25	45

\*Tm : température de fusion (en °C)

**Annexe 9 : Caractéristiques du programme d'hybridation de la Q-PCR pour *S. salivarius*  
K12**

Le programme d'hybridation se décompose en plusieurs étapes :

Étapes	Température (°C)	Durée
Dénaturation	95 °C	15 min
Dénaturation	95 °C	15 sec
Réplication	60 °C	30 sec
Polymérisation	72 °C	30 sec

Les trois dernières étapes sont répétées 40 fois (40 cycles).

# Abstract

This thesis aims to better understand the effect of oral environmental conditions on the behavior of the probiotic bacteria *Streptococcus salivarius* K12.

Growth and maintenance of *S. salivarius* K12 have been characterized in a complemented artificial saliva (CAS), designed for this study. In this medium, *S. salivarius* demonstrated high specific growth rate and low lag time, but it did not produce active bacteriocins. However, the survival of *S. salivarius* K12 during stationary phase was affected during fermentation in CAS medium. This was mainly explained by a reduced synthesis of proteins involved in energy and glycogen metabolisms. Thus, despite an increased sensitivity in stationary phase, the "complemented artificial saliva" allowed the growth and maintenance of *S. salivarius* K12.

The effects of several environmental oral factors on *S. salivarius* K12 were determined in complemented artificial saliva. Adding sucrose decreased cellular viability. Enzymes added to their physiological concentration also affected the bacteria. Lysozyme increased *S. salivarius* mortality by acting on cellular wall. Peroxidase enhanced viability, by reducing the redox potential. The key role of redox potential on *S. salivarius* K12 was confirmed by the negative impact of the injection of air containing 5% CO<sub>2</sub>, which increased redox potential. The amylase demonstrated both positive (biomass increase) and negative roles (reduced growth rate). Consequently, studies involving oral bacteria must integrate these environmental factors that affected the bacterial physiological state.

Continuous cultures, taking into account the variations in salivary flow and the periodical supply of nutrients, and combining all environmental conditions previously identified, allowed simulating oral dynamic conditions. From our results, a good adaptation of *S. salivarius* K12 took place in these culture conditions. Cells were able maintaining a constant level of cultivability despite nutritional starvation and wash out. Some molecular mechanisms explaining this bacterial adaptation have been characterized: activation of alternative carbon sources pathways, energy storage, and increase of natural genetic competence.

Finally, this work made it possible identifying some mechanisms used by *Streptococcus salivarius* K12 to adapt itself to the oral environment, through the establishment of *in vitro* methods for studying the behavior of oral bacteria.

**Keywords:** *Streptococcus salivarius*, oral environment, artificial saliva, physiological state, proteome, transcriptome, stress, continuous culture

# Résumé

Ce travail de thèse vise à mieux comprendre l'effet de l'environnement buccal sur le comportement d'une bactérie orale probiotique, *Streptococcus salivarius* K12.

La croissance et la maintenance de *S. salivarius* K12 ont tout d'abord été caractérisées dans une salive artificielle complétée (CAS) conçue pour l'étude. Dans ce milieu, cette bactérie démontre un taux de croissance élevé et un temps de latence court, mais elle ne produit pas de bactériocines actives. La survie de *S. salivarius* K12 en phase stationnaire est, en revanche, affectée dans le milieu CAS. Ce phénomène est expliqué par une synthèse moindre des protéines impliquées dans le métabolisme énergétique, dont celui du glycogène. Toutefois, malgré une sensibilité accrue en phase stationnaire, le milieu CAS permet la croissance et la maintenance de *S. salivarius* K12.

Les effets de plusieurs facteurs environnementaux spécifiques de la bouche, sur *S. salivarius* K12, ont été déterminés en milieu CAS. Ainsi, l'apport de saccharose, conduit à une dégradation de la viabilité. Des enzymes, ajoutées à leur concentration physiologique, affectent également les cellules bactériennes. Le lysozyme accroît la mortalité de *S. salivarius* par son action sur la paroi bactérienne. La peroxidase améliore sa viabilité en diminuant le potentiel redox du milieu. Le rôle clé du potentiel redox sur *S. salivarius* K12 est confirmé par l'impact négatif de l'injection d'air enrichi à 5% de CO<sub>2</sub>, qui accroît le potentiel redox. Enfin, l'amylase a démontré un rôle à la fois positif (augmentation de la biomasse) et négatif (diminution du taux de croissance). En conséquence, les études impliquant des bactéries orales se doivent de prendre en compte ces facteurs environnementaux influant sur les l'état physiologique bactérien.

La mise en place de cultures continues respectant les variations de flux salivaire et permettant l'apport périodique de nutriments, tout en combinant l'ensemble des conditions environnementales identifiées précédemment, a permis de simuler la dynamique des conditions buccales. Les résultats démontrent que *S. salivarius* K12 est bien adapté à ces conditions de culture. Les cellules sont capables de se maintenir à un niveau de cultivabilité constant, malgré la carence nutritionnelle et le lessivage auxquels elles sont soumises. Certains mécanismes moléculaires expliquant cette adaptation ont été caractérisés : activation des voies d'utilisation de sources de carbone alternatives, stockage de l'énergie, augmentation de la compétence génétique naturelle.

Finalement, ces travaux ont permis d'identifier certains mécanismes permettant à *Streptococcus salivarius* K12 de s'adapter à l'environnement buccal, grâce à la mise en place de méthodes d'étude *in vitro* du comportement des bactéries orales.

**Mots clés :** *Streptococcus salivarius*, environnement buccal, salive artificielle, état physiologique, protéome, transcriptome, stress, culture continue