



Les micro-organismes du microbiote fromager survivent-ils à la digestion et peuvent-ils avoir un effet immunomodulateur sur l'hôte ?

Nadège Adouard

► To cite this version:

Nadège Adouard. Les micro-organismes du microbiote fromager survivent-ils à la digestion et peuvent-ils avoir un effet immunomodulateur sur l'hôte ?. Alimentation et Nutrition. AgroParisTech, 2015. Français. NNT : 2015AGPT0012 . tel-03000970

HAL Id: tel-03000970

<https://pastel.hal.science/tel-03000970>

Submitted on 12 Nov 2020

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

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



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

En vue d'une présentation et d'une soutenance publique par

Nadège ADOUARD

le 26 janvier 2015

Les micro-organismes du microbiote fromager survivent-ils à la digestion et peuvent-ils avoir un effet immunomodulateur sur l'hôte ?

Directeur de thèse : **Pascal BONNARME**
Co-encadrement de la thèse : **Daniel PICQUE**

Jury

M. Pascal BONNARME,	Directeur de Recherches, INRA, Grignon
M. Jean FIORAMONTI,	Directeur de Recherche, INRA, Toulouse
M. Benoît FOLIGNE,	Chargé de Recherche, Institut Pasteur de Lille
M. Christophe LACROIX,	Professeur, ETH Zürich
Mme Sophie LANDAUD,	Professeur, AgroParisTech, Grignon
Mme Claire LE HENAFF	Professeur, ENSCPB-IPB, Bordeaux
M. Daniel PICQUE,	Ingénieur de Recherche, INRA, Grignon
Mme Annabelle ZGODA,	Responsable Recherche Appliquée, Lactalis, Redon

Directeur de Thèse
Examinateur
Invité
Rapporteur
Examinatrice
Rapporteur
Co-Directeur de Thèse
Examinatrice

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires (UMR782) de l'Institut National de la Recherche Agronomique et AgroParisTech à Grignon, dirigé successivement par Isabelle Souchon et François Boué que je remercie pour leur accueil au sein du laboratoire.

J'exprime ma reconnaissance à Claire LeHénaff, Professeur à l'ENSCP de Bordeaux et Christophe Lacroix, Professeur à l'ETH Zürich, pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Je tiens également à remercier Jean Fioramonti, Sophie Landaud et Annabelle Zgoda de participer à ce jury de thèse en tant qu'examineurs.

Je remercie le CNIEL pour avoir financé en partie ce travail et pour l'intérêt porté à ce projet. Je remercie plus particulièrement les membres de la mission Syndifrais ayant régulièrement évalué les résultats de ces travaux.

Je souhaite tout particulièrement remercier mon directeur de thèse, Pascal Bonnarne, Directeur de Recherche à l'INRA, pour sa disponibilité, son éclairage toujours pertinent ainsi que son soutien. Merci de la confiance et de l'autonomie que tu m'as accordées. Je tiens également à te remercier pour tes traits d'humour ainsi que pour ton côté très physionomiste. Ces trois ans de collaboration ont vraiment été un plaisir.

Je remercie aussi Daniel Picque pour le co-encadrement de cette thèse, ainsi que Marielle Bouix, pour leurs conseils tout au long de mon travail.

Je tiens également à remercier Benoît Foligné pour m'avoir accueillie dans son équipe le temps des expérimentations en animalerie, ainsi que pour tous ses précieux conseils pendant tout le projet. Mention spéciale pour ton accueil gastronomique et touristique dans cette très belle ville de Lille. Merci à Coline et Jérôme d'avoir été aussi impliqués dans le projet ainsi que dans les tournois de ping-pong.

Je remercie également toutes les personnes qui m'ont aidée dans la réalisation de cette thèse. Merci à Thomas, alias d'La Tomate, le papa du digesteur, sans qui ces innombrables manip auraient été beaucoup moins agréables. Merci à mon stagiaire Laurent, pour avoir gardé ta bonne humeur et ta motivation malgré les levers aux aurores pour nourrir le digesteur ou faire des fromages. Merci à Marie-Noëlle pour sa participation aux fabrications fromagères.

Un immense merci à Eric sans qui la transcriptomique n'aurait pas été possible. Merci de ta patience à toute épreuve, de tes conseils et de ta bonne humeur. Merci à Hervé pour avoir toujours eu le sourire lorsque je déboulais dans ton bureau avec une nouvelle idée d'automatisation de traitement de données. Merci à Séverine, Agnès et Julie, mes colocs de bureau. Grâce à votre bonne humeur, notre bureau sans fenêtre était bien plus agréable !

Un très grand merci à toutes les personnes du laboratoire ayant contribué de près ou de loin au bon déroulement de cette thèse et qui ont rendu mon passage au GMPA si agréable. Merci à Steven pour ses discussions constructives, Françoise et Christophe pour leurs conseils avisés, Jérôme pour son aide concernant la protéomique, Sarrah pour la cytométrie en flux. Je remercie aussi Brigitte, Armelle, Bruno, David, Thierry et tous les autres membres du GMPA pour leur bonne humeur.

Un immense merci à mes collègues doctorants. Hélène, pour avoir été si bon public à mes blagues pas toujours top niveau et mes dessins vraiment pas dignes des Beaux-Arts. Je t'attends avec mon costume de Licorne sous le bras, j'espère que ta flûte de pan progresse ! Merci aussi pour ta présence et nos conversations

enrichissantes. Grégoire, a.k.a Grosware Rambo Burge, mon « alter-ego » masculin (ce n'est pas moi qui le dit...) pour ton humour décapant, nos conversations en roue libre sur la syntaxe, les cénotaphes callipyges et j'en passe, mais aussi pour ton amitié et ton soutien dans les moments pas toujours simples. Je te dédie cette phrase « Si vous ne supportez pas l'oppression, choisissez la bière pression ». Merci à Guillaume-Grumpy pour sa joie de vivre débordante (!), son découpage d'oignons si particulier et ses raclées à Perfect Dark. Merci à Thuy-Minh pour avoir été une coloc au top pendant les congrès et une partenaire de badminton digne représentante de l'Asie toute entière. Merci à Solenne pour sa bonne humeur et son pain pas toujours au top mais qu'on allait quand même mâcher avec application ;). Merci à Leticia, ma péruvienne préférée, pour ta présence, ton sourire et ta fameuse recette de burritos ! Merci à Vincent pour la course passée et toutes les autres à venir ;). Merci pour nos conversations sport ! L'Ultra du Mont Blanc nous attend !

Un très grand merci à Gaspard pour ton amitié, ta présence lorsque j'en ai eu besoin, nos footings dans la boue et toutes nos conversations parfois sans queue ni tête :). Et oui, tu cours plus vite que moi, mais c'est de la triche, cause you're Batman. Merci à Carlito, Armindo, Clémence et Romain pour les bonnes soirées grignonaises crêpes/marades/films intellectuels. Merci à mes camarades de badminton, Johann, Alain, Etienne et tous les autres.

Merci à tous mes amis non grignonnais, à commencer par Maud, ma coloc-du week-end-duet. Merci pour ton amitié sans faille, ta relecture pointilleuse, ta bonne humeur et ton entrain quelles que soient les situations ainsi que ton soutien dans les moments difficiles. Hvala dobro pour tout ! Merci à Claire-Krabby pour son amitié, son écoute, son canapé et son gratin dauphinois sans fromage (!), hvala à toi aussi. Merci à Sarah pour son entrain sans limite et son humour toujours au top. Merci à Caro, ma chinoise préférée. Merci à Andy pour ne pas avoir craqué pendant nos sessions natation et pour ses lasagnes légendaires ! Merci à Lauriane et Caroline (ma laulautte et ma carotte), pour leur amitié depuis les bancs de la fac. Ca y est, j'ai terminé ! Le Crête Mitochondriale Rolling Band Orchestra va pouvoir reprendre du service.

Je n'oublie évidemment pas mon frère Quentin et ma sœur Floriane, qui ont toujours été présents, même si ce que je fais reste parfois un mystère ! Un merci tout particulier à ma maman. Merci de m'avoir encouragée quels que soient mes choix et de m'avoir soutenue jusqu'au bout. Merci à mes grands-parents d'avoir toujours encouragé ma curiosité. Il est loin le temps où tu m'apprenais les divisions en découpant des gâteaux Pépé et où Mémé relisait mes dictées.

Et enfin, je dédie ce travail de thèse à mon Papa Guy. Et oui, il m'a fallu trois ans pour faire du fromage et pouvoir (presque) démontrer qu'en manger c'est bon pour la santé. Je te revois me taquiner, avant même que je n'aie commencé : « mais ça ton arrière-grand-mère l'avait déjà compris, et elle les faisait avec du lait cru ses fromages, elle ! ». Merci Papa, pour m'avoir portée (et même supportée) pendant 28 ans. Merci de m'avoir appris que l'esprit critique, la curiosité et la persévérance sont des choses essentielles dans la vie. Merci d'avoir réussi à me faire comprendre que l'on peut partager ses convictions tout en acceptant la controverse. La vie n'est pas toujours juste, mais le jardinier averti que tu étais avait raison lorsqu'il disait qu'on récolte au moins en partie ce que l'on sème. Tu ne seras pas là pour les prochaines semailles et récoltes, mais tu m'auras bien « mise sur la route » comme tu disais. Je vais tâcher de continuer à faire mûrir tout ça et tenter de choisir de bons chemins en emportant tes conseils et ton humanisme dans mon sac à dos.

Index des abréviations

	<u>Anglais</u>	<u>Français</u>
SCFA/AGCC	short chains fatty acids	acides gras volatiles à courtes chaines
AOC /AOP	protected designation of origin	appellation d'origine contrôlée / protégée
CD	crohn disease	maladie de Crohn
CNIEL	national center for interprofessional dairy industries	centre national interprofessionnel de l'economie laitière
DCs	dendritic cells	cellules dendritiques
DIDGI	gastrointestinal dynamic digester	digesteur dynamique gastro-intestinal
DSS	dextran sodium sulfate	sulfate de dextran sodique
FAO	food and agricultural organization	organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture
WHO/OMS	world health organization	organisation mondiale de la santé
IBD /MICI	inflammatory bowel disease	maladie inflammatoire chronique de l'intestin
IECs	intestinal epithelial cells	cellules épithéliales intestinales
IFN γ	interféron γ	ilnterferon γ
IL-10/12/6	ilnterleukine -10/12/6	ilnterleukine -10/12/6
MAMP	microbe-associated molecular pattern	motif moléculaire associé aux micro-organismes
PBMCs	peripheral blood mononuclear cells	cellules sanguines mononuclées périphériques
PBS	phosphate buffer saline	tampon phosphate salin
SAA	serum amyloid A	sérum amyloïde A
TLR	toll-like receptor	récepteur de type toll
TNBS	trinitrobenzene sulfonic acid	acide trinitrobenzène sulfonique
TNF α	tumor necrosis factor	facteur de nécrose tumorale
CFU/UFC	colony forming unit	unité formant colonie

Liste des tableaux

Tableau 1 : Récapitulatif des étapes de la digestion et des principales transformations se produisant dans chaque compartiment	23
Tableau 2 : Comparaison de la composition de différents modèles de digestion <i>in vitro</i> batch	42
Tableau 3 : Comparaison des conditions opératoires de différents modèles de digestion <i>in vitro</i> batch	43
Tableau 4 : Caractéristiques spécifiques à chacun des modèles de digestion <i>in vitro</i> dynamique présentés.....	48
Tableau 5 : Limites et pistes d'amélioration des modèles de digestion <i>in vitro</i> dynamiques	49

Figure 1 : Carte de France des Produits AOP	15
Figure 2 : Schématisation des différentes étapes de fabrication d'un fromage à pâte molle	16
Figure 3 : Microbiote des fromages à pâtes molles : origine et biodiversité.....	18
Figure 4 : Principaux compartiments et organes sécrétoires du tube digestif	22
Figure 5 : Les zones anatomiques principales de l'estomac	24
Figure 6 : Variation de la composition ionique du suc gastrique.....	25
Figure 7 : Evolution du pH dans un estomac lors de la digestion de différents bols alimentaires.	27
Figure 8 : Propagation des mouvements péristaltiques au sein de l'Estomac	27
Figure 9 : Courbes de vidange gastrique pour un solide.....	29
Figure 10 : Schématisation de l'intestin grêle figurant l'estomac et le côlon ascendant	31
Figure 11 : Schéma de la jonction entre le duodénum et l'arbre bilio-pancréatique.....	32
Figure 12 : Formule générale d'un acide biliaire.....	33
Figure 13 : Schéma général de la synthèse des acides biliaires	34
Figure 14 : Absorption des lipides et des acides aminés par les entérocytes.....	36
Figure 15 : Schéma du tractus digestif humain.....	36
Figure 16 : Schéma de principe récapitulant les étapes du modèle consensus (COST Infogest).....	44
Figure 17 : Principaux dispositifs de digestion <i>in vitro</i> dynamiques actuellement utilisés.....	46
Figure 18 : Exemple d'adaptation de bactéries « neutrophiles » au stress acide.	52
Figure 19 : Mécanismes d'action et cibles pathologiques potentiels de micro-organismes,	57
Figure 20 : Interaction entre un micro-organisme alimentaire et le système lymphoïde du TD.....	58
Figure 21 : Formules semi-développées du TNBS et du DSS.....	60
Figure 22 : Stratégie générale adoptée au cours de ce travail de thèse.....	62

Sommaire du manuscrit

Préambule	7
Introduction	12
1. Les fromages à pâtes molles	14
2. La digestion chez l'homme.....	22
4. Bactéries alimentaires et stress digestif	51
5. Micro-organismes alimentaires et immunomodulation	56
Objectifs et Stratégie	61
Résultats & Discussion.....	63
Chapitre 1 : Caractérisation d'une sélection de micro-organismes issus d'écosystèmes fromagers au regard de leur survie à un stress digestif in vitro et de leur effet immunomodulateur in vitro.....	65
Chapitre 2 : Impact de la croissance en écosystème sur la résistance au stress in vitro de micro-organismes fromagers et comparaison avec les conditions de croissance de laboratoire.	96
Chapitre 3 : Etude de l'effet immunomodulateur de deux fromages aux profils opposés dans deux modèles de colites murins	127
Chapitre 4 : Caractérisation de la réponse au stress digestif in vitro « batch » d'une bactérie à Gram-négatif et d'une bactérie à Gram-positif par des outils moléculaires	155
Conclusion & Perspectives	190
Bibliographie	197
Annexes.....	209

- Préambule -

Le lien entre alimentation et santé est ancien et la communauté scientifique se penche sur le sujet depuis longtemps déjà. En effet, plus de 170 000 articles contiennent pour mots clés « Food » et « Health » dans la base de données MEDline, sur une période s'étchelonnant de 1960 à 2014. Cependant, la compréhension de mécanismes et des interactions entre l'Aliment et le Consommateur sont encore à leurs balbutiements. Le projet scientifique du Laboratoire Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires (LGMPA) s'inscrit - pour une partie de ses activités - dans une meilleure compréhension de la déconstruction de l'Aliment dans le tube digestif et à tenter d'élucider la relation entre l'Aliment et l'Individu pour lequel il est essentiel.

L'équipe Aliment Digestion Perception (ADP) est impliquée dans des projets tels que Modaltub¹ - programme prioritaire du département Caractérisation et Elaboration des Produits Issus de l'Agriculture (CEPIA) - , rassemblement de scientifiques de l'INRA travaillant à « l'élucidation du devenir de l'aliment dans le Tube Digestif » et prend aussi part au COST InfoGest² dont l'objectif est de permettre à des scientifiques européens, mais aussi hors des frontières de l'Europe, de se réunir et de construire un cadre et des projets communs autour de la thématique « Effet de l'alimentation sur la santé humaine » (Minekus et al., 2014). Dans le but de continuer à élargir ses activités, le LGMPA - en lien avec d'autres laboratoires INRA - a développé un système de digestion *in vitro* dynamique baptisé le Digesteur Dynamique Gastro-Intestinal (DIDGI) (Ménard et al. 2013). Ce DIDGI permet de réaliser des séries d'expérimentations dans des conditions les plus standardisées possibles et sur une grande diversité de matrice alimentaire. A date, des émulsions, des gels laitiers, des produits végétaux, de la viande hachée ont, entre autre, été testés.

L'équipe Ecosystèmes Microbiens fromagers (EcoMic), quant à elle, est spécialisée dans l'étude des écosystèmes fromagers. Elle a acquis une expertise des flores de surface des fromages à pâte molle, notamment par l'utilisation d'outils moléculaires (*e.g.* génomique, méta-génomique, méta-transcriptomique et protéomique) et par la création d'écosystèmes fromagers de taille réduite permettant l'étude des interactions micro-organismes/micro-organismes et micro-organismes/matrices fromagères, lors de l'affinage (Bonaïti et al., 2005 ; Mounier et al., 2008). La participation à des projets ANR tels qu'EcoMet (2007-2010) (Ecosystème fromager : étude fonctionnelle du métabolisme du soufre, coord. P. Bonnarne; Forquin et al. 2011; Cholet et al. 2007) ou encore le projet ANR-ALIA ExEco (2010-2014) (Etude méta-transcriptomique et biochimique de

¹http://www4.inra.fr/var/internet4_national_cepia/storage/htmlarea/PRESENTATION_structuration_Modaltub.pdf

² <https://www.cost-infogest.eu/ABOUT-Infogest>

l'écosystème fromager: pour un contrôle accru de l'EXpression d'un ECOSystème alimentaire complexe, coord. P. BONNARME), a permis de continuer de développer des outils permettant une meilleure compréhension du fromage en tant qu'écosystème.

C'est à l'interface de ces deux équipes qu'est né le projet ECODIGE, acronyme d'ECOSystème et DIGEstion. Il a pour enjeu majeur de poser les premiers jalons vers une compréhension du devenir des constituants de l'écosystème fromager lors de leur passage dans le tractus digestif. Une composante immunologique a aussi été ajoutée ; ECODIGE ayant pour second enjeu de commencer à caractériser l'éventuel effet immunomodulateur des micro-organismes constitutifs de cet écosystème fromager sur le consommateur. Pour cela, le projet a été mené en collaboration avec l'équipe Bactéries Lactiques et Immunité des Muqueuses (BLIM) de l'Institut Pasteur de Lille (IPL). Le projet ECODIGE est parti du constat suivant : la population française consomme annuellement 16kg de fromage affiné (24kg en comptant les fromages blancs). Si le raisonnement est placé au niveau des micro-organismes, avec une quantité de cellules viables comprise entre 10^8 et 10^9 par gramme de produit affiné (Bockelmann 2002), les 16 kg de fromage représentent une ingestion moyenne de micro-organismes avoisinant les 10^{12} - 10^{13} cellules viables par an et par consommateur. Cette quantité de micro-organismes mise en regard de l'ingestion journalière de 10^9 cellules viables, communément conseillée lors de la prise de probiotiques, (Boylston et al. 2004), fait du fromage un aliment fermenté sur lequel il est intéressant de se pencher quant à la résistance aux stress digestifs et au potentiel immunomodulateur des micro-organismes qu'il contient.

A date, l'essentiel des études menées sur l'effet « santé » que peuvent avoir les micro-organismes présents dans les produits laitiers ont consisté soit à identifier de nouveaux candidats probiotiques (*e.g.* bactéries lactiques et propioniques (Cousin et al. 2011 ; Saarela et al. 2000)) soit à lutter contre les micro-organismes pathogènes qui entrent dans l'organisme lors de l'ingestion de produit laitiers (*e.g.* *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* (Begley et al., 2003 ; Barbosa et al., 2012)). Le fromage en tant qu'aliment n'a, quant à lui, été étudié presque exclusivement qu'en tant que vecteur d'organismes. En effet, son pouvoir tampon et éventuellement sa structure, en font un candidat intéressant pour protéger les candidats probiotiques des stress rencontrés lors du transit digestif ; et les délivrer viables au niveau du lieu d'action recherché, bien souvent le côlon (Salaun et al., 2005 ; Sharp et al., 2008). Les seuls travaux (à notre connaissance) visant à étudier la résistance à la digestion et l'effet santé potentiel de micro-organismes « technologiques » sont ceux de Lay et al. (2004) et Firmesse et al. (2008) concernant le Camembert.

Ainsi, aucune étude n'a encore cherché à caractériser la réponse au stress digestif de micro-organismes technologiques couramment utilisés dans l'affinage des fromages ainsi que leur potentiel effet sur l'immunomodulation intestinale. En revanche, très récemment, les travaux de David et al. (2014) ont mis en évidence la survie à la digestion ainsi qu'une activité biologique de certains organismes d'intérêt alimentaire et notamment issus de fromage.

C'est donc dans ce contexte que se place mon travail de thèse dont les objectifs sont :

- (i) caractériser une sélection de micro-organismes – procaryotes et eucaryotes - représentatifs d'un écosystème de fromage à pâte molle du point de vue de leur capacité à induire une réponse immunomodulatrice ;
- (ii) développer une méthode afin de déterminer la capacité (ou non) de ces micro-organismes à résister au stress digestif ;
- (iii) développer un modèle fromager permettant de mettre en évidence une éventuelle modification de cette capacité de survie aux stress digestifs après une croissance en condition d'affinage réel;
- (iv) tester deux écosystèmes aux profils immunomodulateurs opposés sur deux modèles de colites murins et déterminer si un effet protecteur peut-être observé
- (v) poser les premiers jalons d'une étude plus fine de la réponse au stress digestif de deux micro-organismes grâce à des outils moléculaires

Pour répondre à ces objectifs, ce travail, financé à part égale par l'INRA et AgroParistech (50 % Bourse du département CEPIA, 50% Bourse ABIES), en partenariat avec le Centre National de l'Interprofession Laitière (CNIEL) et de sa mission scientifique « Syndifrais », a été encadré par Pascal BONNARME (INRA, UMR 782, LGMPA, Equipe Ecomic, Thiverval-Grignon, France), et co-dirigé par Daniel PICQUE (INRA, UMR 782, LGMPA, Equipe ADP, Thiverval-Grignon, France) ainsi que par Benoît FOLIGNE (Institut Pasteur de Lille, Equipe BLIM, Lille, France).

Publications & Congrès

Articles

N. Adouard, B. Foligné, J. Dewulf, M. Bouix, D. Picque, P. Bonnarme. *In vitro* characterization of the digestive stress response and immunomodulatory properties of microorganisms isolated from smear-ripened cheese. International Journal of Food Microbiology (*accepté*)

N. Adouard, L. Magne, T. Cattenoz, H. Guillemin, B. Foligné, D. Picque, P. Bonnarme. Survival of cheese-ripening microorganisms in a dynamic simulator of the gastrointestinal tract. Food Microbiology (*accepté avec révision*)

C. Plé, **N. Adouard**, J. Breton, J. Dewulf, B. Pot, P. Bonnarme, B. Foligné. Designing specific cheese-ripening ecosystems to shape immune effects of dairy products? (*publié, 2015*)

N. Adouard, E. Dugat-Bony, P. Bonnarme. Transcriptomic and Proteomic analysis of the response to an *in vitro* digestive stress of two cheese-isolated microorganisms. (*in preparation*)

Communications orales

N. Adouard*, B. Foligné, L. Magne, T. Cattenoz, M. Bouix, D. Picque, P. Bonnarme. Do microflora of smear-ripened cheese survive to ingestion and can they have immunomodulatory properties? CBL, Club des Bactéries Lactiques, 16-18 octobre 2013, Bordeaux, France. (*Français*)

N. Adouard*, B. Foligné, L. Magne, T. Cattenoz, M. Bouix, D. Picque, P. Bonnarme. Do microflora of smear-ripened cheese survive to ingestion and can they have immunomodulatory properties? EFFOST meeting 2013, European Federation of Food Science and Technology, 12-15 novembre 2013, Bologna, Italie. (*Anglais*)

N. Adouard*, B. Foligné, C. Plé, L. Magne, T. Cattenoz, D. Picque, P. Bonnarme. Survival and immunomodulatory effect of surface-ripened cheese microflora : a first study. Food Micro 2014, 1-4 septembre 2014, Nantes. (*France*)

Posters

N. Adouard*, B. Foligné, M. Bouix, D. Picque, P. Bonnarme. La flore microbienne fromagère est-elle capable de survivre aux stress digestifs ? Rencontre des Microbiologistes de l'INRA, 13-15 novembre 2012 – L'Isle-sur-la-Sorgue, France. (*Français*)

N. Adouard*, B. Foligné, L. Magne, T. Cattenoz, E. Dugat-Bony, D. Picque, P. Bonnarme. Survival and immunomodulatory properties of surface-ripened cheeses microflora : a case study. CoST Infogest 3rd International Conference on Food Digestion 2014, 11-13 mars 2014, Wageningen, Pays-Bas. (*Anglais*)

- Introduction -

Table des matières : Introduction

1. Les fromages à pâtes molles	14
1.1. Importance du marché des fromages en Europe et en France	14
1.2. Technologie des fromages à pâte molle.....	14
1.2.1. <i>L'ensemencement et la coagulation</i>	16
1.2.2. <i>L'égouttage et le tranchage</i>	17
1.2.3. <i>Le salage et l'affinage</i>	17
1.3. Les fromages à pâte molle: une biodiversité importante et une implantation séquentielle ..	18
1.3.1. <i>Les bactéries lactiques (LAB) « starters »</i>	18
1.3.2. <i>Les organismes eucaryotes : levures acido-tolérantes et champignons filamenteux..</i>	19
1.3.3. <i>Les organismes procaryotes : bactéries d'affinage non lactiques</i>	20
1.4. Micro-organismes et écosystème modèle utilisés lors de la thèse.....	21
2. La digestion chez l'homme.....	22
2.1. La bouche	23
2.2. L'estomac.....	24
2.2.1. <i>Les sécrétions gastriques</i>	24
2.2.2. <i>Le brassage du bol alimentaire et la fabrication du « Chyme »</i>	27
2.2.3. <i>La vidange gastrique</i>	29
2.3. L'intestin grêle	30
2.3.1. <i>Le duodénum</i>	31
2.3.2. <i>Le jéjunum et l'iléon</i>	35
2.4. Le gros intestin	37
3. Principaux modèles d'étude de la digestion des aliments.....	38
3.1. Expérimentations <i>in vivo</i>	38
3.2. Etudes <i>in vitro</i> : modèles statiques et dynamiques.....	40
3.2.1. <i>Modèles de digestion « batch » ou statiques</i>	41
3.2.2. <i>Modèles de digestion dynamique</i>	45
3.3. Bilan	50
4. Bactéries alimentaires et stress digestif.....	51
4.1. Réponse générale au stress des bactéries	51
4.2. Réponse au stress acide rencontré dans l'estomac	52
4.3. Réponse au stress biliaire rencontré dans le duodénum	53
4.4. Matrice fromagère et résistance au stress digestif	55
4.5. Conclusion	55
5. Micro-organismes Alimentaires et immunomodulation	56
5.1. Pourquoi considérer les micro-organismes d'origine fromagère d'un point de vue immunomodulateur?	56
5.2. Place de l'immunomodulation dans l'ensemble des interactions potentielles entre micro-organismes alimentaires et hôte.....	56
5.3. Immunomodulation : définition et mécanismes.....	57
5.4. Description de l'approche adoptée dans ces travaux de thèse	59

1. LES FROMAGES A PATES MOLLES

1.1. Importance du marché des fromages en Europe et en France

Le fromage est l'un des plus anciens moyens de conserver le lait et des preuves de l'existence de sa fabrication ont été attestées depuis le sixième millénaire avant notre ère (Salque et al, 2012).

L'Europe produit annuellement 9 millions de tonnes de fromage (50% de la production mondiale) (Eurostat, 2013). La France quant à elle se situe au deuxième rang européen des pays producteurs de fromage – entre respectivement l'Allemagne et l'Italie - avec 1,9 millions de tonnes fabriquées chaque année soit un peu plus de 20 % de la production de l'Union Européenne et 10% de la production mondiale. Le chiffre d'affaires 2011 de l'industrie fromagère (hors fromages frais) s'élève à plus de 6,35 milliards d'euros dont 2,1 milliards concernent les fromages à pâtes molles. La balance commerciale de la France concernant les échanges de fromage est largement bénéficiaire avec un excédent de 1,7 milliard d'euros pour l'année 2012, dont 78 % de l'export et 96 % de l'import s'effectue avec d'autres pays de l'Union Européenne (CNIEL, 2013).

Les français consomment chaque année un peu plus de 26 kg par habitant et par an, ce qui en fait le plus grand consommateur de l'Union. La France est réputée comme étant le "pays du fromage" pour sa consommation certes, mais aussi du fait de la diversité de son offre.

Elle dénombre en effet plus de 1000 sortes de fromages dont 45 bénéficiant d'une « Appellation d'Origine Contrôlée » (AOC) ou d'une « Appellation d'Origine Protégée » (AOP) (CNIEL, 2013). Concernant les fromages à pâte molle en particulier, leur consommation représente 25 % de la consommation totale de fromage, juste après les pâtes pressées cuites.

1.2. Technologie des fromages à pâte molle

Les fromages à pâte molle sont définis dans la norme internationale Codex Alimentarius (CODEX STAN A-6-1973. Adopté en 1973. Révision 1999. Amendé en 2006, 2008, 2013) comme étant tous les fromages dont l'extrait sec dépasse 67 % durant la période de saumurage. En France, cette catégorie renferme aussi bien les produits traditionnels qui bénéficient du label AOC/AOP, souvent produits à partir de lait cru, que des produits industriels plus modernes et plus standardisés (Figure 1).

Selon la conduite de l'affinage, deux types de croûte peuvent se développer sur les fromages à pâte molle permettant de diviser cette famille en deux sous-familles : les pâtes molles à croûte fleurie (ex. Brie, Camembert, Coulommiers) et les pâtes molles à croûte lavée ou croûte morgée (ex. Epoisses, Livarot, Maroilles, Munster). Malgré l'hétérogénéité des fromages à pâte molle, plusieurs points communs caractérisent la fabrication de ces fromages (Figure 2).



Figure 1 : Carte de France des Produits AOP (Source : CNIEL 2013)

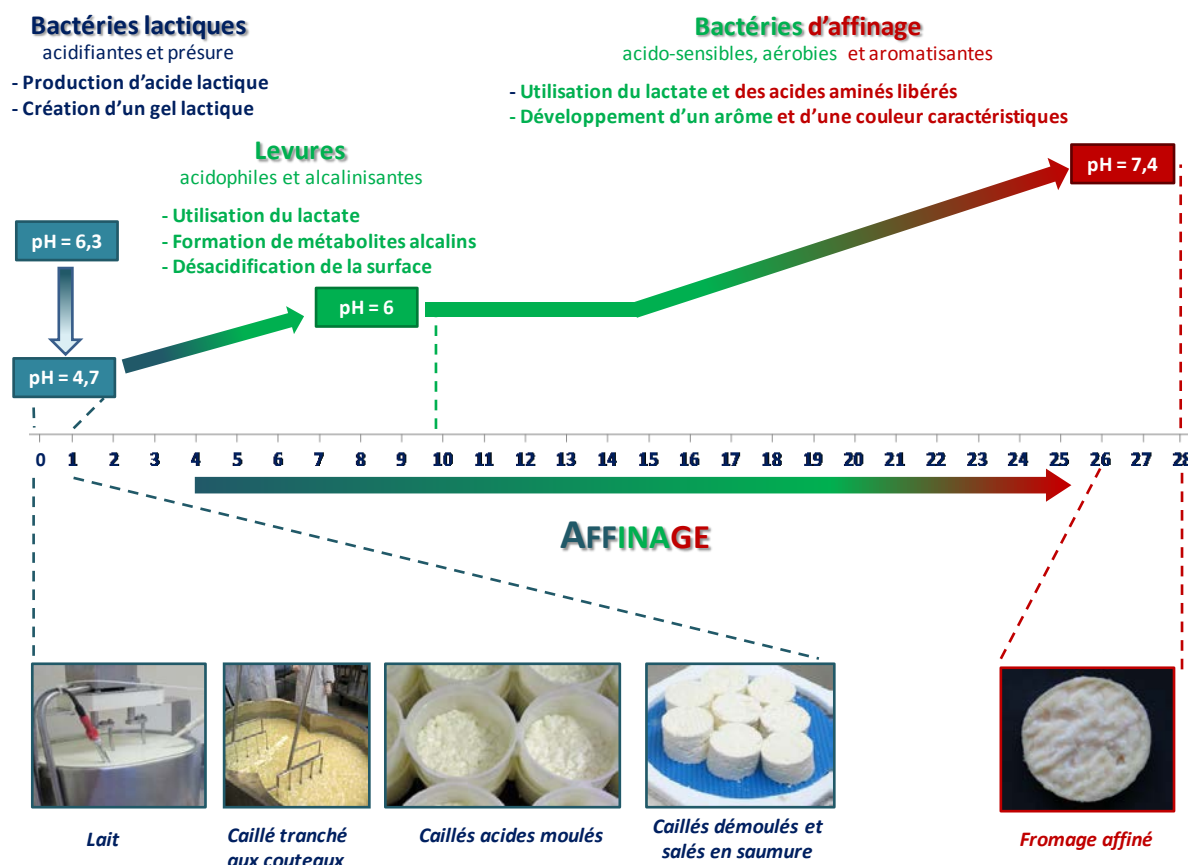


Figure 1 : Schématisation des différentes étapes de fabrication d'un fromage à pâte molle

1.1.1. L'ensemencement et la coagulation

La coagulation est une étape de transformation chimique majeure du lait, conduisant à la séparation des fractions solubles et insolubles du lait. Elle peut être de type enzymatique (présure), lactique ou mixte (bactéries et présure). La coagulation enzymatique fait intervenir la présure, préparation enzymatique issue de la caillette (4ème poche de l'estomac) du veau. La présure se compose essentiellement de chymosine, enzyme protéolytique spécifique des liaisons phénylalanine-méthionine de la caséine. (Alais, chap. 21, 1975). La coagulation lactique implique des bactéries lactiques (Lactic Acid Bacteria, LAB) qui fermentent le lactose – principal glucide du lait - en acide lactique.

Cette flore lactique est naturellement présente dans le lait par contamination au moment de la traite dans la méthode traditionnelle. De manière à mieux maîtriser le développement de cette flore le lait peut aussi être pasteurisé puis ensemencé avec une culture de ferments lactiques préalablement préparée (Alais, chap. 21, 1975). Dans le cas des fromages à pâte molle, cette coagulation est dite « mixte » puisque la température du milieu (28 à 35 °C) et le pH de l'emprésurage (6,3 et 6,4) permettent à la fois l'action des enzymes et le développement des bactéries lactiques. Certaines technologies ajoutent aussi les ferments d'affinage à cette étape de la fabrication (Cogan et al., 2014, chap. 10).

1.2.2. L'égouttage et le tranchage

A la coagulation du lait, s'ensuit un phénomène spontané d'expulsion de l'eau contenue dans le gel laitier appelé synérèse. Cette synérèse consiste en une contraction du réseau de caséines renfermant les globules gras et expulsant le lactosérum. L'égouttage peut se faire spontanément après moulage du caillé dans des moules perforés, mais également par pressage et/ou cuisson. Avant d'être moulé, le caillé est tranché en grains plus ou moins gros, afin d'augmenter la surface d'égouttage. Ce sont ces étapes de tranchage et d'égouttage qui vont conditionner en grande partie l'extrait sec du fromage et donc sa structure finale. Le type de pâte fromagère est très souvent lié à la façon dont a été menée cette étape.

1.2.3. Le salage et l'affinage

L'étape de salage est destinée à protéger le caillé contre l'installation de micro-organismes indésirables ainsi qu'à favoriser l'égouttage par drainage du sérum. Il contribue également à la formation de la croûte. Par la régulation de l'activité de l'eau (a_w), le sel module le développement des micro-organismes et favorise les activités enzymatiques au cours de l'affinage. Le salage peut être effectué par immersion dans une solution de saumure (NaCl) concentrée, à sec par frottement à la surface, ou encore par incorporation du sel dans le caillé broyé.

La plupart des fromages à pâte molle ont une teneur finale en NaCl comprise entre 1,5 et 2,0 %.

L'affinage correspond donc à une succession de transformations biochimiques, réalisées à la fois par des enzymes déjà présentes dans le lait ou le caillé, et par des enzymes synthétisées par le microbiote qui se développe au cours de la maturation (bactéries, levures et/ou moisissures) (Choisy et al, 1997a ; Mahaut et al., 2000). Le temps d'affinage varie en moyenne de 12 à 45 jours suivant les fromages et les qualités organoleptiques désirées. Cette étape est d'autant plus importante concernant les fromages à pâte molle que la grande majorité de la typicité des fromages obtenus dépend du développement de la flore aérobie de surface lors de l'affinage, celle-ci intervenant tardivement (Brennan et al., 2004).

Sur le plan chimique, il s'agit d'une série de transformations que sont : glycolyse des sucres résiduels, protéolyse des caséines, et lipolyse. Ces réactions libèrent respectivement des acides volatiles, des acides aminés, et des acides gras volatiles, responsables de l'arôme du fromage. Les différentes populations de micro-organismes évoluent en étroite interaction au long de l'affinage, de manière concourante ou successive. On distingue donc plusieurs microflore, ayant chacune un rôle spécifique.

1.3. Les fromages à pâte molle : une biodiversité importante et une implantation séquentielle

Comme nous l'avons vu précédemment, les micro-organismes responsables de l'affinage sont d'une grande biodiversité, qu'ils soient encemés ou que leur implantation soit le fait de leur présence dans l'environnement d'affinage. Appartenant à la fois aux Règnes Procaryote qu'Eucaryote, leurs dynamiques d'implantation ainsi que les grands rôles de chaque catégorie majeure du microbiote fromager sont abordés dans les sections suivantes.

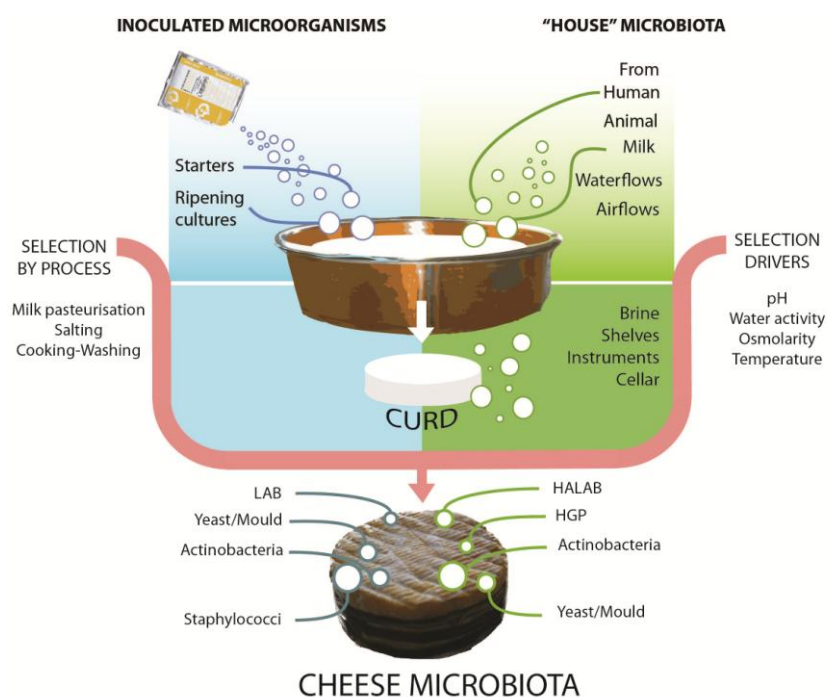


Figure 3 : Microbiote des fromages à pâtes molles : origine et biodiversité (d'après Irlinger et al. 2014)

1.3.1. Les bactéries lactiques (LAB) « starters »

Dans le processus de transformation du lait en fromage à coagulation lactique ou mixte, la microflore lactique est la première flore à intervenir. Les bactéries lactiques sont classées en différents genres, selon la composition de leur paroi cellulaire, leurs caractéristiques biochimiques et génétiques (Stiles & Holzapfel, 1997). Les genres *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus* sont majoritairement retrouvés dans les fromages. Les genres *Lactococcus* et *Streptococcus* sont utilisés comme « starters lactiques » et présents dès l'étape de coagulation du lait, provenant soit de la flore naturelle du lait, ou bienensemencés dans le cas de fromages au lait pasteurisé. La fonction principale de ces bactéries est de dégrader le lactose, sucre majoritairement contenu dans le lait, pour produire de l'acide lactique (fermentation lactique) (Beresford et Williams, 2004).

Cette microflore lactique, présente dès la maturation du lait, est dominante durant les premiers jours d'affinage ($\approx 10^9$ UFC.g⁻¹ de caillé). Son développement est essentiel pour préserver le caillé d'une contamination par des germes pathogènes éventuellement présents dans le lait cru ainsi que pour assurer la formation optimale du caillé. Sa concentration et son activité stagnent puis décroissent dans le fromage au fur et à mesure de l'affinage.

Les autres genres de LAB dites Non-starter Lactic Acid Bacteria (NSLAB) peuvent aussi contribuer à l'affinage par leurs activités enzymatiques ; cependant cette thèse ne portant pas sur ces micro-organismes, ils ne seront pas évoqués plus en détails.

1.3.2. Les organismes eucaryotes : levures acido-tolérantes et champignons filamenteux

Les levures hémi-ascomycètes au caractère acido-tolérant font partie de la deuxième vague de flores s'implantant lors de l'affinage d'un fromage à pâte molle et peuvent être présentes soit à la suite d'une contamination par l'environnement d'affinage – saumure, cave, ustensiles - soitensemencées lors de l'affinage – par exemple pendant le salage (morgeage) de la croûte dans le cas d'une technologie croûte lavée. Les espèces les plus fréquemment isolées et identifiées en fromagerie appartiennent aux genres *Candida*, *Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Torulaspora* et *Yarrowia* (Chamba et Irlinger, 2004). Ces levures ayant un métabolisme essentiellement - voire strictement – aérobique, on estime que les concentrations en cellules viables sont de 100 à 1000 fois plus importantes sur la croûte qu'au cœur de la pâte atteignant des concentrations de l'ordre de $10^6 - 10^9$ UFC.cm⁻² de croûte de fromage (Chamba et Irlinger, 2004). L'espèce *Debaryomyces hansenii*, très halo-tolérante, est la première à se développer. Son activité désacidifiante consiste en une dégradation de l'acide lactique et en une protéolyse des caséines aboutissant à la libération de molécules alcalinisantes telles que l'ammoniaque. La présence de moisissures superficielles caractérise les fromages à pâtes molles et croûtes fleuries. Sur le plan technologique, les espèces les plus étudiées appartiennent au genre *Penicillium*. Elles contribuent, en métabolisant l'acide lactique, à la neutralisation de la pâte et produisent de nombreuses enzymes qui participent à la maturation du fromage et à l'implantation des bactéries d'affinage acido-sensibles.

L'espèce *Penicillium camembertii* est la plus décrite, puisque se trouvant à la surface de la majorité des fromages à croûtes fleuries tels que le Camembert ou le Brie (Lenoir et al., 1983). Les travaux de cette thèse reposant essentiellement sur des micro-organismes de fromage à pâte molle à croûte lavée, *Penicillium camembertii* ne sera que brièvement évoqué et conservé comme seul champignon filamenteux utilisé lors de certaines expériences.

1.3.3. Les organismes procaryotes : bactéries d'affinage non lactiques

L'utilisation de nouvelles techniques de séquençage culture-indépendantes a permis d'identifier jusqu'à 15 genres dominants concernant la flore bactérienne non-lactique de fromages à pâte molle - abondance moyenne supérieure à 1% du total des genres identifiés, basé sur un séquençage 16S et sur un échantillon de 137 fromages provenant de 10 pays différents (Wolfe et al., 2014) -. Ce chiffre s'élève à près de 60 genres en tenant compte de ceux dont l'abondance est inférieure à 1%.

Ces nouvelles techniques d'identification complètent et confirment des travaux plus anciens comme ceux, entre-autres, de Mounier et al. (2005) qui, par des techniques culture-dépendantes (isolement sur milieu gélosé) portant sur un échantillon de 4 fromages irlandais, ont référencé des espèces dominantes appartenant aux genres décrits dans les travaux de Wolfe et al. (2014). Les travaux de cette thèse se concentrant sur une sélection restreinte de ces micro-organismes, seuls les genres identifiés comme dominants à l'heure actuelle seront abordés. De plus, le choix de l'espèce a aussi pris en compte l'utilisation technologique de certains de ces micro-organismes.

Ainsi, la flore d'affinage non-lactique des fromages à pâte molle est en majorité composée de bactéries à Gram-positif aérobies stricts appartenant aux phyla des Firmicutes et des Actinobactéries (Wolfe et al., 2014). Les bactéries à Gram-négatif sont, quant à elles, surtout représentées par la famille des *Enterobacteriaceae* dont certaines sont aérobies facultatives (Montel et al., 2014). Pour cette raison, la flore d'affinage non-lactique se développe essentiellement en surface des fromages à pâte molle.

Les bactéries corynéformes représentent la part la plus importante de la flore à Gram-positif aérobie stricte, avec des genres tels que *Brevibacterium* et *Corynebacterium*. Un autre genre appartenant aux actinobactéries (*Arthrobacter*) figure parmi les plus représentés ; les Firmicutes sont essentiellement représentés par le genre *Staphylococcus* (Mounier et al., 2005 ; Gori et al., 2013). Le genre *Hafnia* se trouvent parmi les représentants majeurs des *Enterobacteriaceae* (aussi bien sur des fromages au lait cru (Wolfe et al., 2014) que sur des fromages au lait pasteurisé comme en témoigne l'étude de Lay et al. (2004) portant sur des camemberts puisqu'utilisé comme « adjunct culture » par certains fromagers.

1.4. Micro-organismes et écosystème modèle utilisés lors de la thèse

L'expertise du laboratoire concernant les bactéries et levures d'affinage des fromages à pâte molles a permis de constituer un écosystème réduit composé 9 micro-organismes, adapté des travaux de Bonaïti et al. (2005). Cet écosystème modèle comprend les espèces suivantes : *Arthrobacter arilaitensis*, *Brevibacterium aurantiacum*, *Corynebacterium casei*, *Hafnia alvei*, *Lactococcus lactis*, *Staphylococcus equorum*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis* et *Geotrichum candidum*.

Une miniaturisation de la fabrication de fromages de type Livarot a été développée (cf. Chapitre 2) Dans le cadre de cette thèse, les étapes de lavage n'ont pas été réalisées et les fromages obtenus possèdent une croûte naturelle dont la flore de surface s'est développée de manière autonome, sans conditionnement par le biais d'un lavage. Nous disposons du génome d'au moins une souche parmi les toutes les espèces précédemment citées ; ceci avait son importance, le quatrième chapitre de cette thèse étant consacrée à l'étude de la réponse aux stress digestifs d'une sélection de ces micro-organismes par des outils moléculaires.

2. LA DIGESTION CHEZ L'HOMME

La digestion est un phénomène physiologique multi-étapes consistant à dégrader les aliments ingérés, entraînant la libération et l'assimilation des nutriments essentiels à notre organisme. La dégradation des aliments fait intervenir des forces mécaniques, enzymatiques et biochimiques, ainsi que des flux de liquides et de solides, tout au long des organes composant le tube digestif qui s'étendant de la bouche au côlon (Figure 4 & Tableau 1) (Smith & Morton, Chap.1, 2010 ; Turgeon et al., 2011).

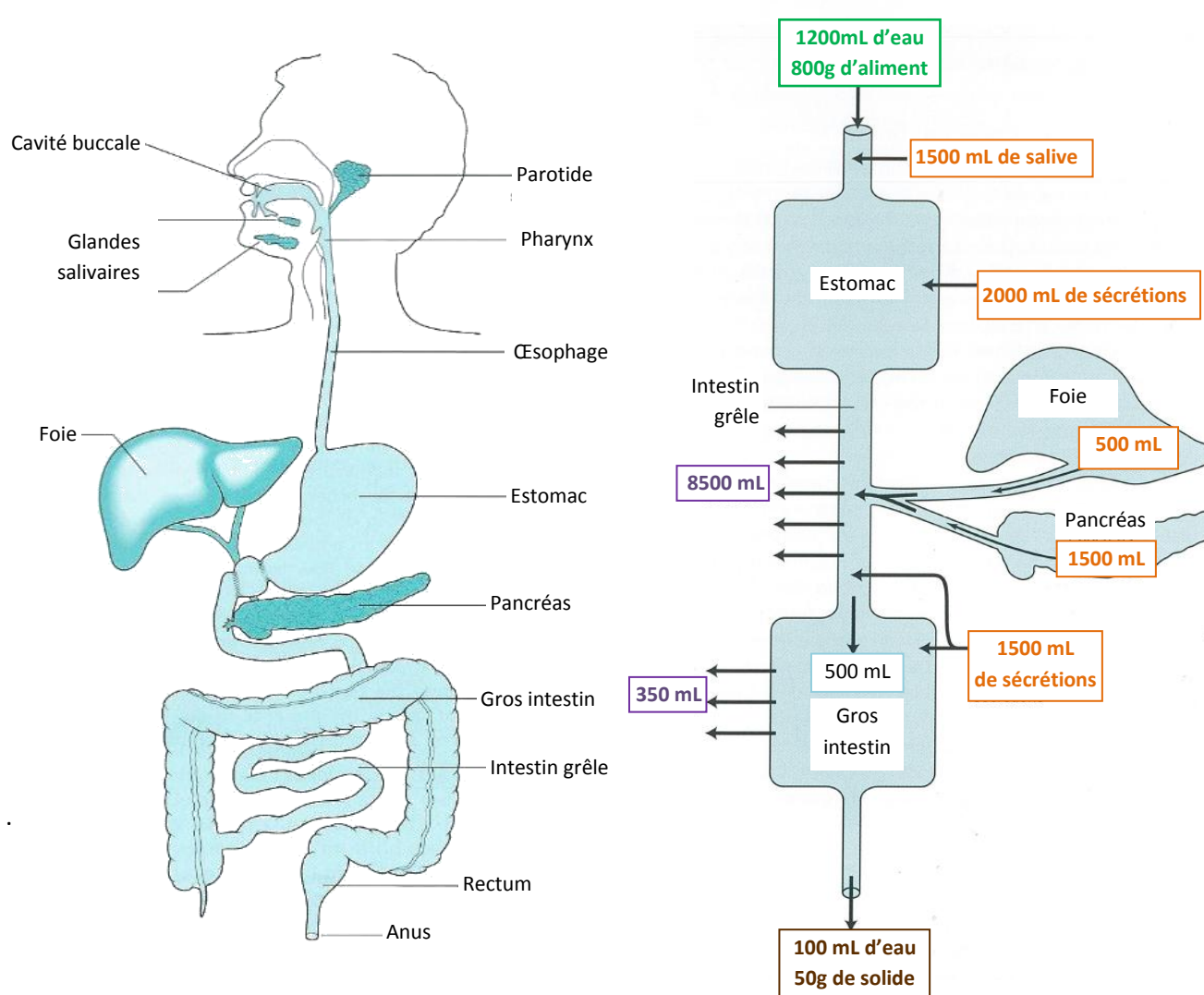


Figure 4 : (a) Principaux compartiments (claire) et organes sécrétoires (foncé) du tube digestif
(b) Volumes de et quantité de liquides/solides étant apportés/sécrétés/réabsorbés/excrétés
au sein du tractus digestif au cours d'une journée (moyenne) (Smith and Morton, Chap.1, 2010)

2.1. La bouche

Le rôle principal de la bouche est la mastication, broyage mécanique réduisant les aliments en petites particules. Le mélange de ces particules à la salive alors secrétée, conduit à la formation du bol alimentaire. La salive est composée essentiellement, d'eau, d'enzymes - α -amylase et lipase - initiant respectivement la dégradation de l'amidon et des lipides, ainsi que de mucine, protéine assurant la lubrification du bol alimentaire (Smith and Morton, Chap.2, 2010).

Tableau 1 : Récapitulatif des étapes de la digestion ainsi que des principales transformations se produisant dans chaque compartiment. (d'après Guerra et al., 2012 ; Turgeon et al., 2011 ; Smith and Morton, Chap.1, 2010)

Etape de la digestion	Action mécanique & temps de transit	Composition biochimique et enzymatique	Résultat
Bouche & œsophage	Mastication et mélange avec la salive 10 s – 2 min	pH neutre α -amylase et lipase linguale Mucine Electrolytes	Constitution du bol Hydrolyse de l'amidon
Estomac	Réduction de la taille des particules du bol (contraction antrales) Mélange avec les sécrétions gastriques Transfert du chyme acide dans le duodénum 15 min – 3h	pH 2 – 5 Pepsine et lipase gastrique Electrolytes Temps de résidence = f(composition et viscosité du bol) Taille des particules < 2 mm	Hydrolyses des protéines et des lipides Réduction de la taille des particules du bol
Intestin grêle	Mouvement péristaltiques Mélange avec les sécrétions bilio-pancréatiques 2h – 5h	pH 5,5 – 6,5 Sécrétions pancréatiques : Electrolytes Trypsine Chymotrypsine Carboxypeptidase Aminopeptidase Elastase Collagénase Lipase pancréatique Amylase Sécrétions biliaires : Acides biliaires Cholestérol Phospholipides Bilirubine	Hydrolyse peptides et acides aminés/triglycérides/sucres Absorption acides aminés/oligosaccharides/mono-glycérides/acides gras Réabsorption de l'eau ($\approx 90\%$)
Gros intestin	Contraction longitudinales 12h – 24h	pH 5 – 7 Fermentation des composés non-digestibles par le microbiote intestinal	Production d'Acides Gras Volatils à Courtes Chaines (AVCC) Absorption de l'eau et concentration des déchets ($\approx 5\%$ supplémentaires par rapport à la sortie du grêle)

2.2. L'estomac

Le bol alimentaire progresse le long de l'œsophage jusque dans l'estomac. Ce dernier se subdivise en quatre zones anatomiques principales : Le fundus, le corps, l'antrum et le pylore (Smith and Morton, Chap.3, 2010).

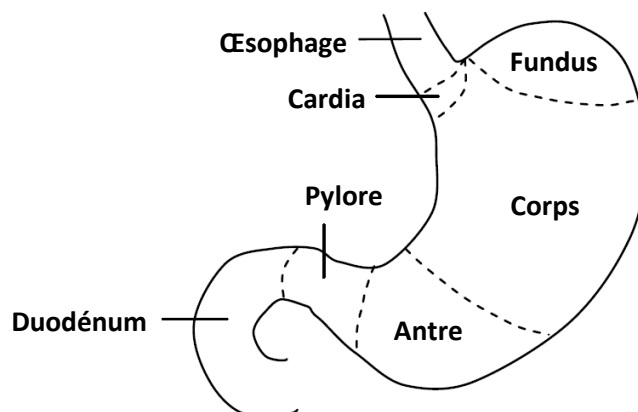


Figure 5 : Les zones anatomiques principales de l'estomac (d'après Kong et al., 2008)

2.2.1. Les sécrétions gastriques

Le corps et le fundus sont le siège du stockage du bol alimentaire et des sécrétions gastriques – de l'ordre de 2L par jour chez un adulte-. En moyenne, un repas est accompagné de 0,5 à 1 fois son volume en sécrétion s'il est liquide et jusqu'à 2 fois son volume en cas de repas solide (Malagelada et al., 1979).

✓ Enzymes & électrolytes

Les principales enzymes composant le suc gastrique sont la pepsine et la lipase gastrique, dégradant respectivement les protéines et les lipides.

La pepsine est une endopeptidase produite par les cellules principales de l'estomac. Elle est sécrétée sous forme d'une proenzyme inactive – le pepsinogène – qui une fois hydrolysée en présence d'HCl, donne une pepsine fonctionnelle. La sécrétion sous forme inactive évite une autodigestion et permet d'assurer que l'enzyme agisse sur les protéines qu'elle rencontrera – plus concentrées qu'elle – dans son environnement d'action. Cette enzyme n'est pas à proprement parler spécifique d'une liaison peptidique en particulier. Elle coupe cependant préférentiellement près des ponts disulfures et au voisinage des acides aminés aromatiques (Nelson et Cox, 2012) ; il lui est

attribué environ 20 % de la digestion des protéines, son action consistant essentiellement à rendre les protéines plus accessibles aux enzymes se trouvant en aval du tractus digestif.

Le rôle de la lipase gastrique, bien que mis en évidence *in vivo* il y a plus de 20 ans par Carrière et al. (1993), a longtemps été sous-estimé. Elle est pourtant reconnue comme contribuant à plus de 10% la digestion des triglycérides alimentaires ; cependant sa concentration et son activité plus faibles que la lipase pancréatique – le ratio lipase pancréatique/lipase gastrique est de 4 en quantité et est supérieur à 20 en activité (Carrière et al., 1993) – ne font pas de l'estomac le compartiment principal de la digestion des lipides, bien que son rôle soit important.

Les ions chlorure (Cl^-), potassium (K^+), sodium (Na^+) composent la majeure partie des ions retrouvés dans le suc gastrique. Leur sécrétion est intimement liée à la sécrétion d'acide chlorhydrique (Figure 6). L'ion bicarbonate (HCO_3^-) est aussi sécrété par l'estomac, afin de maintenir un pH moins acide aux abords de la muqueuse gastrique. Cependant, il n'est que très peu retrouvé dans les sécrétions étant donné sa décomposition rapide en CO_2 et H_2O afin de maintenir cette neutralité au niveau de la muqueuse. Certains ions tels que le calcium (Ca^{2+}), ou encore le magnésium (Mg^{2+}), sont aussi présents en très faible concentration dans les sécrétions gastriques ; leur rôle est cependant important puisqu'ils peuvent activer ou inhiber l'action des enzymes gastriques ex. Ca^{2+} et lipase (Zangenberg et al., 2001)

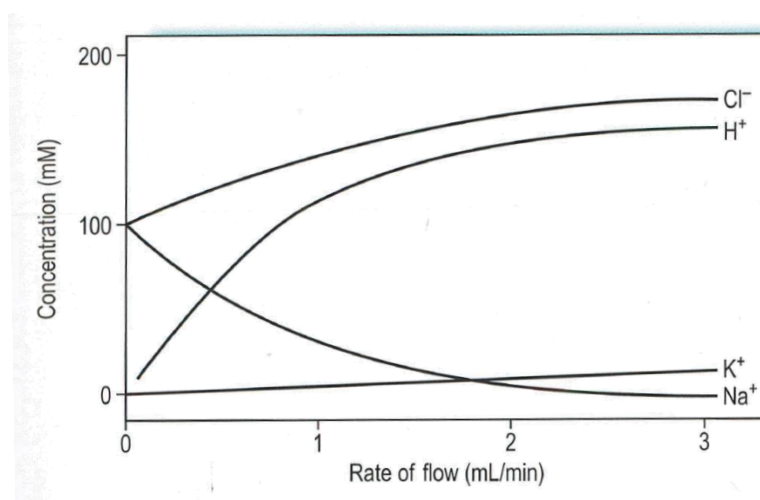


Figure 6 : Variation de la composition ionique du suc gastrique(en mM) en fonction du débit de sécrétion de chaque ion (en mL/min)

✓ *Acide Chlorhydrique et acidification de l'estomac*

A jeûn, le pH gastrique est compris entre 1 et 3. L'acidité gastrique a une action bactéricide et favorise la dégradation des protéines en s'approchant du pH optimal de fonctionnement de la pepsine, compris entre 1,5 et 4,5 (EC 3.4.4.1, Base de données Brenda Enzyme, 2014). L'arrivée du bol alimentaire dans l'estomac provoque dans un premier temps une augmentation du pH gastrique lié à l'effet tampon du bol alimentaire. Suite à cela, les cellules pariétales de l'estomac tapissant le fundus produisent et sécrètent activement de l'acide chlorhydrique (HCl) se dissociant sous forme d'ion H^+ et Cl^- une fois dans la lumière de l'estomac. Cette sécrétion est dite active puisqu'elle nécessite l'action de pompes à protons ATP dépendantes ainsi que l'utilisation du potassium comme contre-ion ; le transfert de proton a en effet lieu contre un gradient de concentration extrêmement important – i.e. $\text{ratio } [H^+]_{\text{plasmatique}} / [H^+]_{\text{lumen}} > 10^7$ –. L'augmentation du pH gastrique et la durée nécessaire à la réacidification du milieu dépend du pH du repas et de son pouvoir tampon (Kalantzi et al. 2006). Les six exemples de cinétiques d'acidification obtenues chez le volontaire humain sain (Figure 7) illustrent la descente du pH luminal de l'estomac tendant vers pH 2, bien que la nature et le pH initial des bols soient différents. Lors d'une ingestion de 600 mL d'une solution de glucose (250 mg.L^{-1}), 20 minutes suffisent à atteindre pH 2 (Calbet et MacLean, 1997). Dans le cas d'une ingestion de 400 mL de lait, environ 60 minutes sont nécessaires pour passer du pH initial de l'estomac rempli de lait (600 mL, pH initial 6,4), à 2 (Minekus et al. 1995) ; alors qu'il faudra 100 minutes pour un repas modèle de 400 mL (458 kcal, contenant protéines, lipides et glucides, pH initial 7) pour atteindre ce même pH 2 (Kong and Singh, 2008).

En conclusion, ces cinétiques montrent que le pH basal après ingestion d'un aliment avoisine pH 2 quelque soit la nature de ce bol, cependant la cinétique que suit cette acidification diffère. Ceci a une implication directe lors du paramétrage des modèles de digestion dynamiques *in vitro* sur lesquels nous reviendrons dans le paragraphe 1.3.

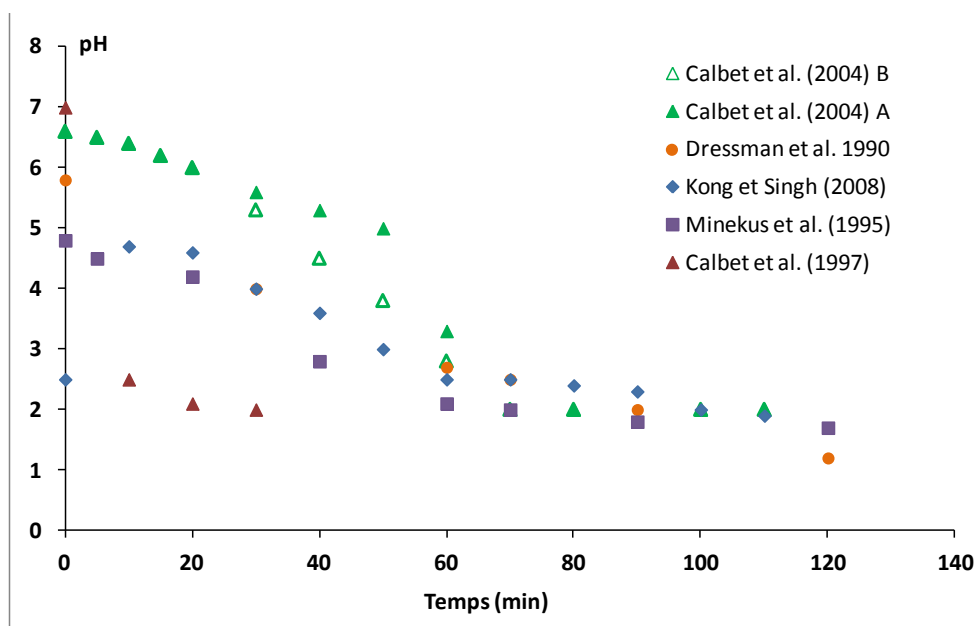


Figure 7 : Evolution du pH dans un estomac lors de la digestion de différents bols alimentaires.

Calbet et Holst (2004) A : hydrolysate de caseines , 600 mL, pH 7, 400 kcal ; Calbet et Holst (2004) B : hydrolysate de proteines de lactoserum, 600mL, pH 7, 136 kcal ; Dressman et al. (1990) : test meal with vegetables, bread and meat, 1000 kcal ; Kong et Singh (2008) : semi-solid test meal, 400 mL, pH 6, 458 kcal ; Minekus et al. (1995) : lait de vache, 400 mL, pH 6,4, 450 kcal ; Calbet et MacLean (1997) : 600 mL, glucose , pH 7, 60 kcal.

2.2.2. Le brassage du bol alimentaire et la fabrication du « Chyme »

L'acidification au sein de l'estomac ainsi que l'action des enzymes, nécessitent un brassage du bol alimentaire. Celui-ci n'est que partiellement déstructuré par la mastication lorsqu'il atteint l'estomac et forme un agrégat de particules plus ou moins grosses, selon la composition et la viscosité du repas. Afin de déstructurer ce bol, des « mouvements péristaltiques » - contractions des muscles lisses de la paroi stomacale - naissent au niveau du corps de l'estomac et se propagent jusqu'à l'antrum (Figure 8).

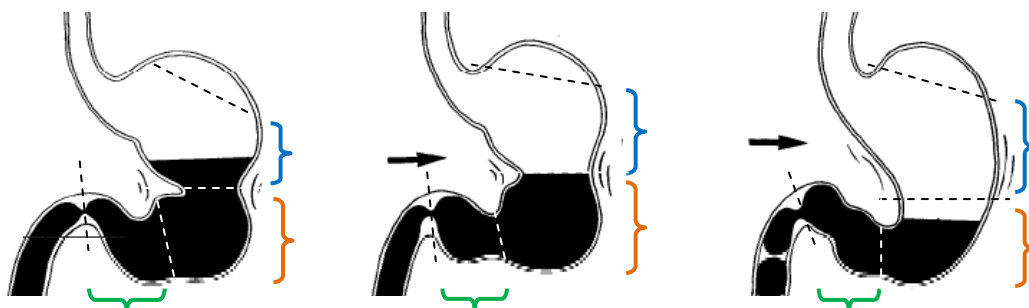


Figure 8 : Propagation des mouvements péristaltiques au sein de l'Estomac (Corps/Antrum/Pylore)

Au sein du corps de l'estomac, le brassage provoqué ne suffit pas à homogénéiser le contenu gastrique jusqu'à son intérieur ; le cœur de l'agrégat est donc protégé des sécrétions gastriques et la dégradation du bol par les enzymes digestives se fait majoritairement en périphérie. C'est cette portion qui est sélectivement évacuée vers l'antrum, du fait de la diminution de sa viscosité (Wickham et al. 2012).

Au sein de l'antrum, les contractions de la muqueuse augmentent la pression stomacale, provoquant une homogénéisation vigoureuse du bol avec le suc gastrique et permettant un broyage efficace des particules. Le bol alimentaire devient alors le « chyme gastrique ». Ces contractions poussent le chyme contre le pylore – sphincter situé entre l'estomac et le duodénum - et sa relaxation permet de faire passer quelques millilitres du chyme dans le duodénum lors de chaque vague de péristaltisme. Durant la période prandiale, c'est la fraction liquide qui est préférentiellement vidangée, la fraction solide nécessitant d'être réduite à des particules de taille avoisinant les 2 mm, le pylore agissant comme un filtre retenant les particules de plus gros diamètre (Smith and Morton, Chap.3, 2010). Une fois le repas terminé et la phase post-prandiale avancée, des particules de tailles supérieures à 2 mm peuvent passer le pylore, de manière à ce que l'estomac se vide malgré la digestion seulement partielle de certains des éléments qu'il contient (Kong et Singh 2008).

2.2.3. La vidange gastrique

La durée de la vidange gastrique, caractérisée par le temps de demi-vidange - $t_{1/2}$, durée nécessaire à ce que la moitié du bol soit vidangé dans le duodénum -, est variable et fonction de paramètres i) liés au sujet - ex. physiologie propre, anatomie, pathologie éventuelle - et ii) liés à la nature du bol - ex. caractère solide ou liquide, viscosité, teneur en calories -.

La nature de l'aliment (liquide, semi-solide, solide) a une grande incidence sur la vidange gastrique. Un aliment liquide aura un temps de demi-vidange généralement compris entre 10 et 60 minutes (Hellström et al., 2006). Un aliment semi-solide, tel qu'un gel laitier, mettra quant à lui entre 50 et 70 min (Minekus et al., 1995); enfin, un aliment solide nécessitera un temps de demi-vidange pouvant être compris entre 60 min et plus de 270 min (Versantvoort et al., 2004). Non seulement les $t_{1/2}$ sont différents, mais les cinétiques de vidange le sont aussi. Depuis le début des années 1980, les cinétiques de vidange de l'estomac ont pu être observées par des techniques de scintigraphie (Figure 9), affinées plus récemment par l'IRM (Marciani et al., 2006). Un liquide aura une cinétique de vidange plutôt exponentielle (i.e. la vitesse à laquelle l'estomac se vide est liée au volume résiduel dans le compartiment) alors que la vidange d'un bol solide comportera une phase de latence (pendant laquelle le transfert vers le duodénum est nul) suivi d'une phase de transfert linéaire (i.e. vitesse de vidange indépendante du volume contenu dans l'estomac).

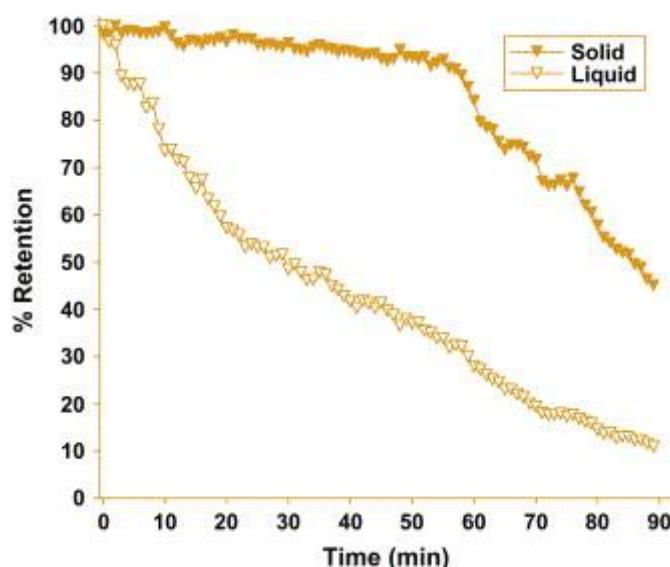


Figure 9 : Courbes de vidange gastrique pour un solide (▼ ; omelette) et un liquide (▽ ; boisson non-alcoolisée)(d'après Hellström et al., 2006).

L'un des modèles les plus utilisés est dit «Elashoff's power exponential curve » (Elashoff et al., 1982) dont la formule se décompose comme suit :

$$f = 1 - 2^{-\left(\frac{t}{t_{1/2}}\right)^\beta}$$

Où f est la fraction résiduelle de chyme, t le temps, $t_{1/2}$ le temps de demi-vidange et β un coefficient décrivant la forme de la courbe de vidange. Une version modifiée tenant compte de la phase de latence a été publiée par Siegel et al. (1988) ; cependant, elle ne sera pas abordée dans nos travaux. Nous avons donc préféré le modèle d'Elashoff, les matrices utilisées étant de natures liquides ou semi-solides. Des variations aussi importantes de $t_{1/2}$ ne sont pas uniquement liées à la nature liquide ou solide du bol mais aussi à la teneur calorique de ce dernier. En effet - à volume ingéré et nature des nutriments la composant identiques- une solution contenant 200 kcal aura un $t_{1/2}$ de 56 minutes contre 92 minutes pour 400 kcal (Kwiatek et al., 2009). Ainsi, plus un bol est calorique et plus la durée de vidange gastrique sera longue.

Le volume ingéré a aussi son importance, celui-ci jouant sur la pression exercée au niveau des parois de l'estomac et du pylore. Toujours d'après les travaux de Kwiatek et al. (2009), à apport calorique identique, un bol de 800 mL aura un temps de demi-vidange plus court qu'un bol de 200 mL. Ainsi, les 400 premiers millilitres du bol de 800 mL transiteront moins longtemps dans l'estomac que les 100 premiers millilitres du bol de 200 mL. Volume et quantité de calories agissent donc en sens inverse, ce qui implique une adaptation de la vidange afin d'extraire au mieux les nutriments tout en tenant compte des contraintes physiques liées à la taille limitée de l'estomac.

La vidange gastrique est donc un mécanisme finement régulé en fonction de différents paramètres liés au bol alimentaire grâce à un système de contrôle à la fois nerveux, hormonal et chimique, dans lequel le rétro-contrôle du duodénum a un rôle clé. La régulation du transit digestif n'étant pas l'objet de ces travaux, nous ne rentrerons pas plus dans le détail de ces mécanismes.

2.3. L'intestin grêle

L'intestin grêle, se compose de trois segments consécutifs - duodénum, jéjunum et iléon -, mesurant respectivement, en moyenne, 50, 500 et 100 cm de long chez l'Homme et d'un diamètre moyen de 3,5 cm (Figure 10). La dégradation des aliments initiée dans l'estomac, se poursuit et se termine dans l'intestin grêle où les constituants du chyme sont réduits en composés simples (acides gras libres, monoglycérides, oligosaccharides, di/tri-peptides et acides aminés).

Ces nutriments libérés sont ensuite absorbés au niveau de la paroi intestinale. L'intestin grêle est aussi le siège de la majorité de la recapture de l'eau arrivant dans le tractus digestif (Smith and Morton, Chap.7, 2010).

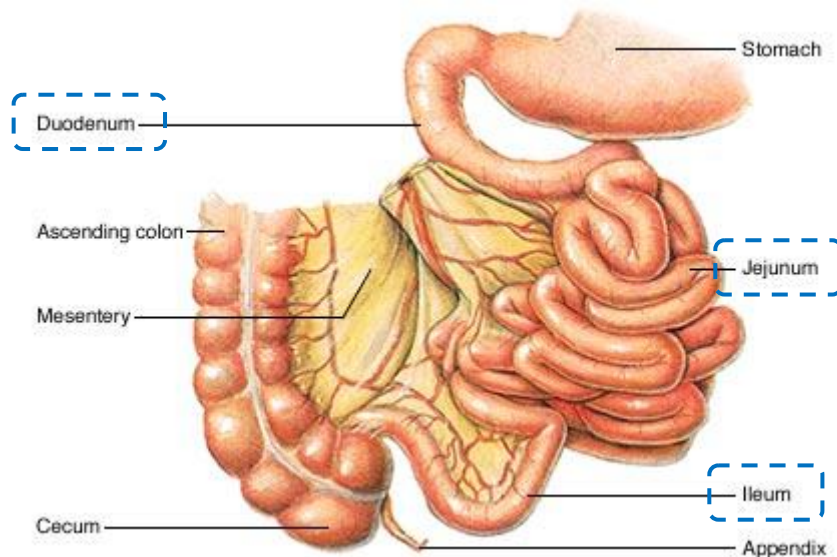


Figure 10 : Schématisation de l'intestin grêle figurant l'estomac (en amont) et le côlon ascendant (en aval)

2.3.1. Le duodénum

Le duodénum est un petit segment de l'intestin grêle, représentant à peine 10% de sa longueur totale. Son rôle est pourtant clé puisqu'il est le lieu de déversement de la majorité des électrolytes et enzymes qui agiront ensuite dans les 90% restants du grêle.

En effet, juste à la sortie du pylore se trouve le sphincter d'Oddi qui assure la jonction entre le foie, la vésicule biliaire et le pancréas, avec l'intestin grêle. Le duodénum fait partie intégrante de l'intestin grêle ; en effet, il n'y a pas de sphincter assurant la séparation d'avec le segment suivant - i.e. le jéjunum -. Cependant, la composition particulière du milieu duodénal dû au déversement de l'arbre bilio-pancréatique ainsi que sa structure - repliement important de la muqueuse, grand nombre de vili à la forme particulière dans le duodénum, présence de glandes à mucus qui ne sont pas retrouvées dans la suite du grêle (i.e. glandes de Brunner), amincissement de la paroi et rétrécissement du diamètre - en font un compartiment qu'il est cohérent de séparer du jéjunum-iléon ; ces derniers sont, par ailleurs, beaucoup plus semblables et seront donc traités dans le même paragraphe (Smith and Morton, Chap.7, 2010).

Le duodénum est le siège de la majorité de l'absorption des glucides alimentaires ainsi que de la mise en place de la dégradation de la majeure partie des triglycérides. Il est aussi le lieu où les protéines déjà partiellement hydrolysées par la pepsine finissent d'être clivées en peptides de petites tailles.

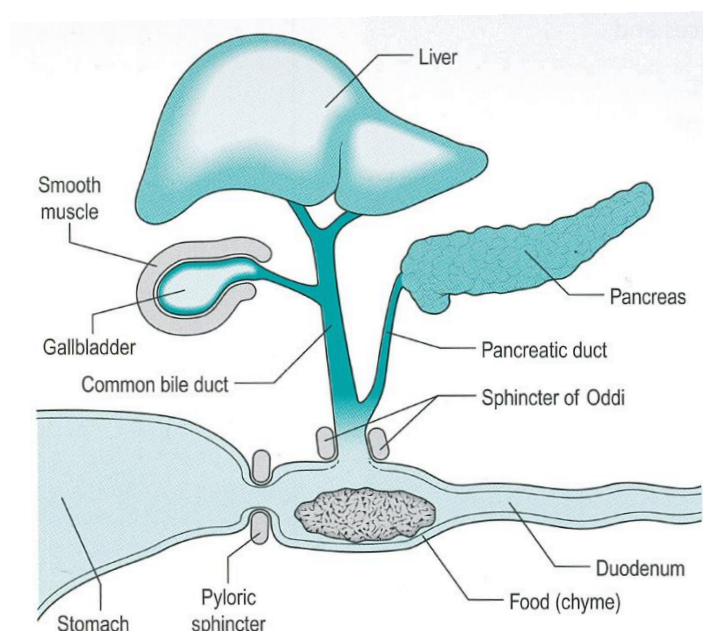


Figure 11 : Représentation schématique de la jonction entre le duodénum et l'arbre bilio-pancréatique (d'après Smith and Morton, Chap.7, 2010)

✓ *Sécrétions de l'arbre hépto-bilio-pancréatique*

Le foie possède quatre grandes fonctions dans l'organisme : i) métabolisme du sang, ii) détoxification de l'organisme, iii) stockage (ex. vitamine, glucides) et enfin iv) nutritionnelle. Seule cette dernière fonction, et plus particulièrement la synthèse de la bile, sera abordée dans ce manuscrit.

La bile est sécrétée dans les hépatocytes du foie à raison de 250-1000 mL par jour chez l'adulte. Elle se mélange à des sécrétions d'électrolytes lors de son transport par les canaux la menant à la vésicule biliaire, son lieu de stockage. Ces sécrétions ont une composition similaire à celles du pancréas et la régulation de leur production est effectuée par une hormone – la sécrétine – produite par le duodénum, dont l'action dépend surtout de la présence d'acide dans le compartiment du tube digestif. Il y a ainsi une boucle de rétrocontrôle entre production de sécrétions alcalines par le foie et acidité du chyme entrant dans le duodénum (Smith and Morton, Chap.6, 2010).

Les acides biliaires sont des molécules ayant pour base un noyau de cholestérol sur lequel se greffera jusqu'à deux fonctions hydroxyles (une des positions peut aussi être occupée par une hydrogène) ainsi qu'une fonction carboxyle (une seule position) (Figure 12).

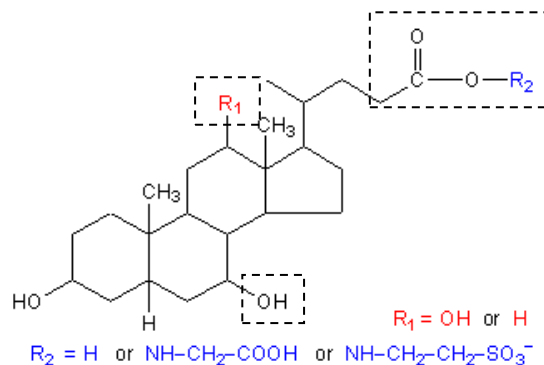


Figure 12 : Formule générale d'un acide biliaire et position des radicaux conduisant aux différents types de sels biliaires primaires synthétisés par le foie. Encadrées en pointillés : fonctions ajoutées au noyau cholestérol.

Les acides biliaires sécrétés par les hépatocytes sont dits primaires et peuvent être « libres » (acide cholique et chénodésoxycholique) ou « conjugués » à un acide aminé, très souvent la taurine et la glycine. Par exemple, une conjugaison avec la taurine conduit à l'acide taurocholique et à l'acide taurochénodésoxycholique. Ces sels biliaires primaires peuvent être modifiés par le microbiote intestinal pour donner des sels biliaires secondaires – *i.e.* acide désoxycholique et acide lithocholique-. Les acides biliaires ont également une action d'inhibition de la prolifération bactérienne et le microbiote « déconjugue » certains des sels biliaires, afin de s'opposer à leur toxicité, et ce en hydrolysant la liaison acide aminé-fonction carboxyle située en position R_2 . Ce mécanisme sera développé dans le chapitre traitant de la résistance des micro-organismes aux sels biliaires. Enfin, les acides biliaires sont en partie recapturés au niveau de l'intestin grêle et retournent au foie via le cycle entéro-hépatique (Figure 13). On trouve ainsi des sels biliaires secondaires qui peuvent être conjugués au niveau du foie, après avoir été transformés au niveau du côlon puis recapturés.

Le cholestérol et la phosphatidylcholine sont deux autres molécules qui se trouvent sécrétées en même temps que la bile par les hépatocytes et qui interviennent dans la fabrication des micelles de sels biliaires.

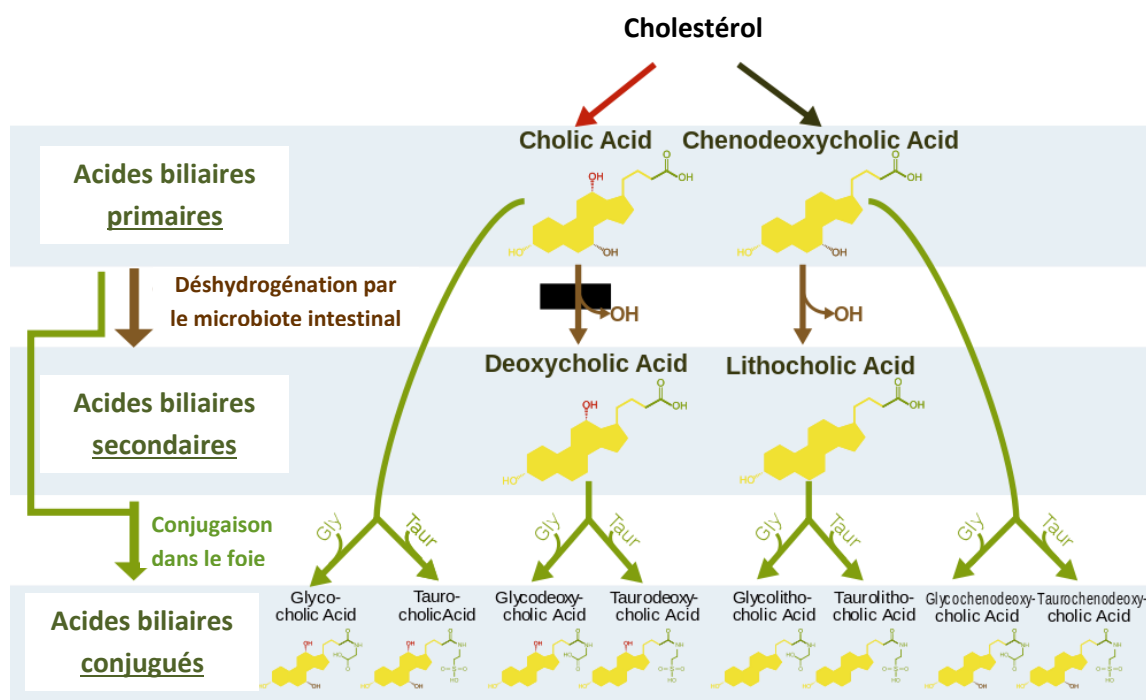


Figure 13 : Schéma général de la synthèse des acides biliaires

Le pancréas est une glande à tissus dits exocrines et endocrines. La partie exocrine sécrète le suc pancréatique - déversé dans le duodénum – alors que la partie endocrine sécrète deux hormones (insuline et glucagon) chargée de réguler la glycémie dans le sang. Seules les fonctions exocrines liées au duodénum seront abordées dans ce manuscrit. Les sécrétions du pancréas exocrine consistent en un mélange d'enzymes d'une part, en un concentrat d'électrolytes d'autre part. Le volume sécrété aboutit à une dilution de moitié du chyme gastrique (Malagelada et al., 1979). Les enzymes que l'on retrouve dans le mélange sont i) des protéases secrétées sous formes de pro-enzymes : trypsine, chymotrypsine, élastase, carboxypeptidase A ainsi qu'une phospholipase ; ii) diverses enzymes secrétées sous forme fonctionnelle : la lipase pancréatique, l' α -amylase ainsi qu'une ribonucléase et des amino-peptidases (Smith and Morton, Chap.5, 2010). La trypsine est activée en premier et active ensuite les autres pro-enzymes, une fois que celles-ci ont atteint le duodénum. Cette régulation permet d'éviter -comme dans le cas de la pepsine- un phénomène d'autodigestion, ces enzymes étant très actives. La lipase pancréatique, quant à elle, nécessite l'action d'une colipase afin d'être fonctionnelle (Borgström et Erlanson, 1973).

Les électrolytes produits par le pancréas sont majoritairement des ions chlorure (Cl^-), potassium (K^+), sodium (Na^+), calcium (Ca^{2+}) et magnésium (Mg^{2+}). L'ion bicarbonate (HCO_3^-) est sécrété en quantité importante lors de la digestion de manière à alcaliniser le chyme gastrique acide arrivant par le pyllore et de permettre l'action des enzymes pancréatiques (Kalantzi et al. 2006).

✓ *Modification du chyme et « vidange » duodénale*

Le duodénum a un rôle essentiel dans le mélange chyme gastrique / sécrétions provenant de l'arbre bilio-pancréatique. Sa forme arquée et les fortes contractions de sa muqueuse aux multiples replis permettent un mélange efficace entre le chyme acide provenant de l'estomac et les enzymes et électrolytes déversés au niveau du sphincter d'Oddi. A jeûn, le pH du duodénum se situe aux alentours de 6,5 et n'est que très peu modifié jusqu'à trente minutes après le début d'un repas. Il peut ensuite diminuer jusqu'à des pH de l'ordre de 5 dans les 90 à 120 minutes suivant le début de la digestion. Il retrouve son pH initial dans les 4 à 5 heures suivant le début du repas (Malagelada et al., 1979). Ces valeurs de pH ainsi que les durées indiquées sont bien entendu sujettes à variation en fonction de la nature de l'alimentation, notamment de la quantité de protéines ingérées, celles-ci ayant un pouvoir tampon élevé (Kalantzi et al., 2006). Les acides biliaries sont très alcalins et participent grandement à la remontée de pH du chyme gastrique, ceci en synergie avec les ions bicarbonates.

Par ailleurs, l'arrivée des sels biliaries permet une émulsion des triglycérides alimentaires sous forme de micelles afin de rendre leur digestion possible par la lipase pancréatique. En effet, la lipase est soluble en phase aqueuse et la surface d'échange grandement augmentée par l'action des sels biliaries et monoglycérides produits lors de la phase de digestion gastrique, ce qui permet d'augmenter la surface de contact entre l'enzyme et son substrat. De plus, les acides biliaries servent aussi à « nettoyer » la surface de ces micelles des produits d'hydrolyse de la lipase de manière à libérer l'interface et à permettre l'accès à des triglycérides encore non digérés. Ils participent donc à la fois à la dégradation des lipides et à l'absorption des produits de cette dégradation.

Concernant le transfert à proprement parler, il s'agit d'une progression régulière du chyme neutralisé, liée à la vidange gastrique.

2.3.2. Le jéjunum et l'iléon

Le jéjunum est le lieu principal de l'absorption des lipides et les protéines au niveau de la bordure en brosse des entérocytes

Figure 14). Les nutriments ainsi libérés passent dans le sang (acides aminés, glucides) et la lymphe (lipides), ainsi rendus disponibles aux organes du corps (Smith and Morton, chap. 8, 2010).

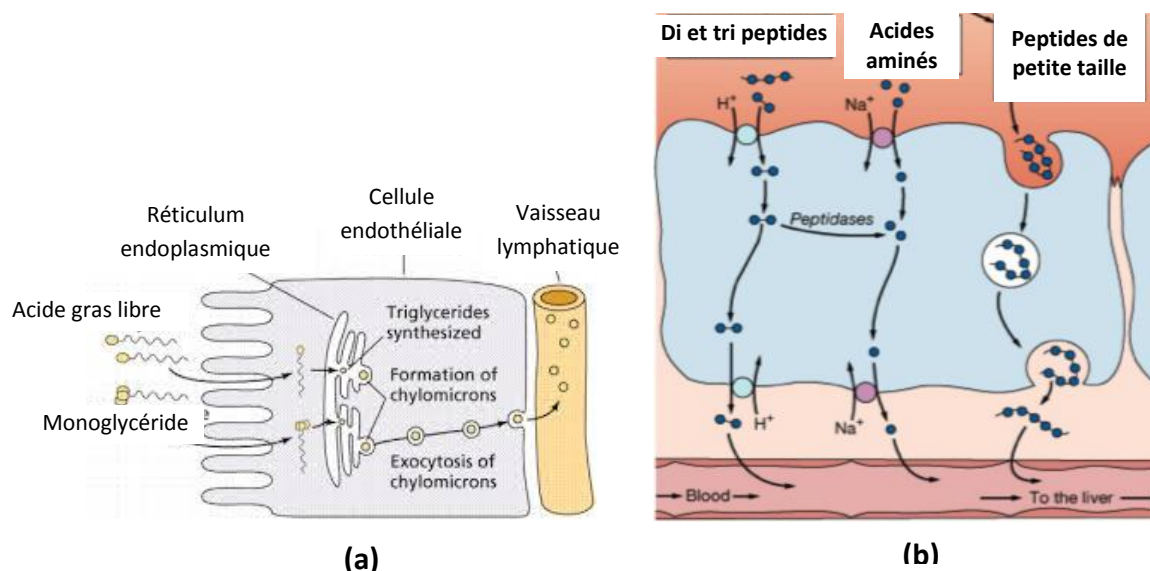


Figure 14 : Absorption des lipides (a) et des acides aminés (b) par les entérocytes

Au sein de l'iléon est initié un processus de concentration des composés non digestibles notamment par une recapture de l'eau contenue dans la lumière du tractus digestif. On observe aussi une présence de plus en plus importante de micro-organismes commensaux appelé « Microbiote Intestinal » ; l'activité de ce dernier prend de plus en plus d'importance à mesure que la jonction intestin grêle-côlon se rapproche (Figure 15).

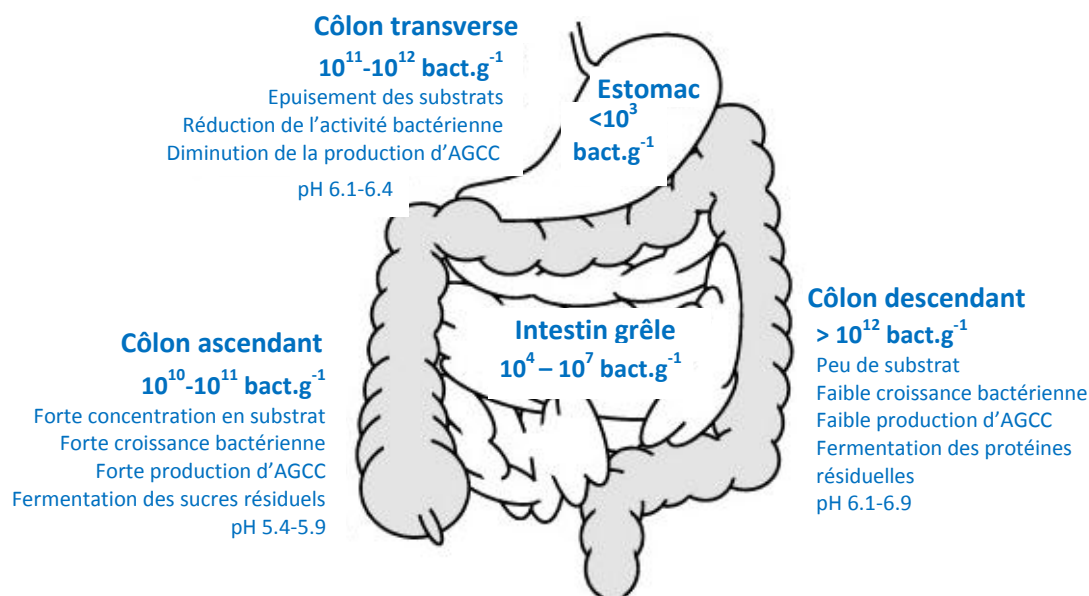


Figure 15 : Représentation schématique du tractus digestif humain : concentration bactérienne par gramme de contenu intestinal et nature de son activité fermentaire dans les différentes sections du gros intestin d'individus sains. SCFA : Short Chain Fatty Acid = AGCC (D'après Payne et.al, 2012)

2.4. Le gros intestin

Le gros intestin (ou côlon) est long d'environ 1,5 m et se situe dans le prolongement de l'intestin grêle. Il sert principalement au stockage des composés non digestibles avant leur évacuation via le rectum. Au sein de ce côlon est implanté le « Microbiote Intestinal ». Il est en étroite relation avec l'organisme de l'hôte, où il remplit plusieurs fonctions parmi lesquelles se trouvent la dégradation de certains composés non-digestibles, la protection contre des bactéries pathogènes par encombrement spatial, ou encore l'activation du système immunitaire par interaction avec les lymphocytes intestinaux (Bäckhed et al., 2005). La majeure partie des espèces constitutives de ce microbiote est acquise dès la naissance et pendant l'enfance, lors des premiers contacts avec des micro-organismes exogènes. Elle dépend donc de l'environnement et du régime alimentaire de l'enfant, favorisant ainsi l'implantation de certains phyla ou genre plutôt que d'autres. Cette flore est dite flore permanente. A cela s'ajoute une flore dite de passage, apportée par notre alimentation, séjournant transitoirement dans le gros intestin. Celle-ci peut potentiellement agir sur la flore permanente et les cellules du système immunitaire, par interaction directe de type micro-organismes/micro-organismes, micro-organismes/hôte, ou via les substances qu'elle sécrète (Prescott *et al.* 2003). Ainsi, la présence de cette flore et le maintien de son équilibre sont capitaux dans la prévention des maladies infectieuses et réactions inflammatoires.

Cette thèse ne s'intéressant pas au dialogue entre le microbiote intestinal et les micro-organismes de passage, tout ce qui concerne la flore intestinale ne sera pas développé.

3. PRINCIPAUX MODELES D'ETUDE DE LA DIGESTION DES ALIMENTS

Le suivi et l'analyse des transformations subies par le bol alimentaire le long du tube digestif est complexe, d'une part à cause de multiples réactions qui ont lieu de manière concomitantes tout le long du tractus digestif, d'autre part car l'accès au milieu dans lequel se déroule ces transformations n'est pas aisé. Il est ainsi nécessaire de mettre en place des modèles, plus ou moins complexes et élaborés dont les points forts et limites seront abordés dans les paragraphes suivants.

3.1. Expérimentations *in vivo*

Les expérimentations *in vivo* peuvent avoir deux objectifs : (i) tester des hypothèses sur des organismes vivants, soit par le biais d'une étude clinique regroupant des volontaires humains possédant un profil déterminé par avance en fonction des hypothèses de travail (ex. pathologie digestive, volontaire sains, âge, sexe, habitudes alimentaires, origine ethnique ou géographique), soit par une étude impliquant des modèles animaux, ceux-ci pouvant différer en fonction de l'objet d'étude (ex. souris au microbiote standardisé, mini-porcs axéniques, lapins). (ii) obtenir des données sur le fonctionnement du tube digestif réutilisable dans le cadre de modèles *in vitro*.

Dans les deux cas, et plus particulièrement lorsque des volontaires sont engagés, le coût du dispositif à mettre en place est très important. Il faut en effet pouvoir garantir la sécurité des volontaires lors des prélèvements qui nécessitent parfois des méthodes intrusives ou encore maintenir des souris axéniques dans des conditions d'asepsie. De plus, des problèmes d'éthiques se posent. On peut citer en exemple les études impliquant des animaux : la phase finale des expérimentations nécessitant bien souvent un sacrifice de la cohorte afin d'accéder aux tissus et organes à prélever, les expérimentateurs se doivent de remplir un certain nombre de règles liés au traitement des animaux (ex. la directive 2010/63/UE du Parlement Européen et du Conseil du 22 septembre 2010, mis à jour le 1^{er} janvier 2013 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques ; ou encore le Décret n°87-848 du 19 octobre 1987 relatif aux expériences pratiquées sur les animaux vertébrés). Ces contraintes éthiques sont d'autant plus rigoureuses que les sujets sont des volontaires humains.

Ajoutées à ces contraintes financières et éthiques, les expérimentations *in vivo* posent aussi le problème des variabilités intra- et inter- individuelles. En effet, un même sujet peut montrer des variations au cours de la période de mesure, pour un paramètre donné - ex. pH de l'estomac, vitesse

de vidange gastrique, motilité intestinale -, voire ce paramètre peut être perturbé par la mesure. A cela s'ajoute la variabilité entre individus d'une même cohorte qui rend souvent l'interprétation des résultats délicate, malgré l'utilisation d'outils statistiques puissants, le facteur limitant étant souvent le nombre réduit d'individus au sein de la cohorte.

Bien que l'utilisation d'individus soit contraignante, l'évolution des techniques d'imagerie médicale notamment, ont grandement facilité l'accès à des informations historiquement très difficile à obtenir. En effet, l'utilisation de canules de prélèvements étaient très invasives (Malagelada et al., 1976) et inconfortables pour les volontaires, sans compter la perturbation provoquée par la simple présence du dispositif. Des techniques non-invasives telles que l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM), ont permis d'avoir accès aux cinétiques de transfert entre les différents compartiments du tube digestif en perturbant le moins possible le sujet (Schwizer et al., 1992).

Plus récemment, les travaux de Marciani et al. (2005) utilisant l'Imagerie EchoPlanaire, (EPI, technique basée sur l'IRM mais plus rapide en terme d'acquisition) ont fait progresser de manière notable la compréhension des mouvements du bol au sein de l'intestin, ainsi que les cinétiques de transfert estomac- duodénum. L'accès aux cinétiques d'acidification au sein de l'estomac ou encore à la motilité au sein de l'ensemble du tractus ont aussi été rendues possibles grâce à l'utilisation de puces sans fils type RFID (Radio Frequency Identification) (Hasler, 2014 ; Timm et al., 2011). Cependant ces techniques, bien que très prometteuses, sont encore récentes et nécessitent des contre-vérifications afin de bien connaître leurs limites d'utilisation (Capareello et al., 2012).

Ainsi, dans l'idéal, les expérimentations *in vivo* sont construites pour vérifier des hypothèses déjà solides, formulées suite à l'utilisation de modèles *in vitro* dans le but soit de valider des observations faites *in vitro*, soit de compléter/affiner les paramètres de ces-dits modèles. La description, les intérêts et les limites de ces modèles *in vitro* sont l'objet de la prochaine section de cette revue bibliographique.

3.2. Etudes *in vitro* : modèles statiques et dynamiques

Le tube digestif peut s'envisager comme un procédé multi-étapes visant à dégrader les aliments et à absorber les nutriments qui en dérivent. Il est ainsi possible de reproduire le tractus en utilisant un raisonnement très analytique et de l'envisager comme un système découpé en opérations unitaires, plus ou moins complexes, dont les paramètres sont fixés en fonction d'extrapolation et/ou d'interpolation de données obtenues par des mesures réalisées *in vivo*. Ainsi, l'étude de la physiologie digestive humaine a conduit à considérer les paramètres suivants comme cruciaux dans l'établissement des modèles de digestions *in vitro* (Venema et al., 2009) :

- L'utilisation des enzymes digestives de manière séquentielle en fonction de leur ordre d'apparition dans le tube digestif.
- La prise en compte du pH, de la présence de co-facteur et co-enzymes, la présence de sels biliaires et, par extension, de molécules donc l'activité peut influencer celle des enzymes.
- Le retrait du milieu digestif des produits finaux de la digestion afin d'éviter l'inhibition des réactions enzymatiques ou la mort du microbiote résident.
- Le mélange du bol alimentaire lors de chacune des étapes de la digestion.
- Les temps de résidences et cinétiques de transfert pour chaque compartiment digestif.
- Les mécanismes de rétro-contrôle de l'organisme.

La construction - ex. le niveau de complexité et l'importance relative donnée à chacun des points précédemment cités - ainsi que l'utilisation de ces modèles est fonction des hypothèses de travail ; ex. une étude préliminaire de la digestion de protéines d'origine végétale ne nécessitera pas un modèle aussi complexe que l'étude de la biodisponibilité des acides aminés provenant d'un repas complet à base de protéines végétales.

Ainsi, les modèles *in vitro* permettent non seulement de s'affranchir de certaines contraintes liées aux expérimentations *in vivo*, mais aussi de sélectionner les paramètres que l'on souhaite étudier et de n'en faire varier qu'un petit nombre, voire un seul. Cette simplification des systèmes biologiques souvent complexes permet d'établir des liens entre des phénomènes difficiles à mettre en évidence lorsque tous les paramètres de la digestion varient en même temps. Les modèles dits « statiques » ou « batch » sont basés sur ce type d'approches. Cette simplification doit cependant être rigoureusement intégrée dans l'interprétation des résultats puisque la digestion reste un phénomène systémique avec des interactions entre des groupes de paramètres variant en même temps. Dans le but de tenir compte de la succession des compartiments du tube digestif et notamment des interactions existants au sein et entre ses compartiments, des modèles de digestion « dynamiques » ont été créés.

3.2.1. Modèles de digestion « batch » ou statiques

Les modèles batch reproduisent un compartiment de la digestion à un instant donné, pour des conditions et des paramètres fixes. Il a déjà été évoqué en introduction de ce paragraphe que la plupart des modèles « statiques » sont conçus en fonction des matrices étudiées. La revue d'Hur et al. (2010) dresse un bilan fourni de différents modèles de digestion batch recensés entre 1997 et 2010, en analysant de manière détaillée 80 références. Cette revue classe – autant que possible – les modèles par nature de l'échantillon étudié (ex. origine végétale, origine carnée, origine minérale, origine lipidique) ce qui conduit parfois à des modèles n'étudiant qu'une classe biochimique particulière, par exemple la digestion de l'amidon avec l' α -amylase comme seule enzyme digestive (Bravo et al., 1998) ou encore la digestibilité des protéines de sorgho (Nunes et al., 2004).

Ces modèles sont certes très éloignés de ce qui se passe réellement lors de la digestion, mais leur utilisation s'avère cruciale lors de la mise en place de modèles « batch » plus complexes. La simplification de leur composition permet, par exemple, d'obtenir des informations telles que le degré maximal d'hydrolyse d'un polymère dans des conditions extrêmes de mise en contact (ex. concentration en enzymes peu réaliste par rapport à la digestion, temps de contact excédent le temps de digestion « physiologique »). Ces modèles simplifiés permettent ainsi de fixer les bornes des paramètres de modèles plus complexes.

Le bilan de la revue de Hur et al. (2010) est le même que celui effectué plus de 10 ans auparavant par Charteris et al. (1998), lors de la publication de leurs travaux concernant la mise en place d'une méthode de digestion *in vitro* pour le screening de candidats probiotiques : il n'y a pas de consensus concernant la fixation des paramètres des modèles. La diversité des modèles rend complexe, voire impossible, la comparaison entre différentes études. Les Tableau 2 et Tableau 3 rendent compte de la diversité de la composition des fluides digestifs ainsi que des conditions utilisées pour une sélection de travaux dont les objets d'études et la complexité varient.

Tableau 2 : Comparaison de la composition de différents modèles de digestion *in vitro* batch

		Parrot et.al (2003)	Zangenberg et al. (2001)	Gil-Izquierdo et al. (2002)	Versantvoort et al. (2005)	Moreno et al. (2005)	Charteris et al. (1998)	Lo Curto et al. (2011) (6)
Objet d'étude		Libération de peptides bioactifs (digestion d'emmental et de caséines)	Impact du Ca ²⁺ sur la digestion des lipides	Libération de composés phénoliques, digestion d'aliments à base de fruits)	Libération de mycotoxines lors de la (digestion d'un repas « test »)	Libération d'allergènes d'origine protéique (digestion noix du Brésil)	Evaluation de la survie de bactéries au potentiel probiotique	Evaluation de la survie de bactéries au potentiel probiotique (matrices MRS et lait)
Tient compte du ratio échantillon/enzymes		Oui Différent selon les enzymes	Oui Variable	Oui Quantité d'enzyme ajustée en fonction de la quantité de substrat	Non Fixe quelque soit la nature du repas	Oui Différents selon les enzymes (ramené à la quantité de protéines présentes dans le milieu)	Oui et Non Dilution de l'échantillon au 1/10 (v/v)	Oui et Non Qté d'enzyme ajoutée dans estomac = f(vol MRS/lait) Qté de jus duodénal fixe quelle que soit la composition de ce qui sort de l'estomac
Elimine les produits de la digestion		Non	Non	Oui (dialyse)	Non	Non	Non	Non
Méthode validée par corrélation avec expérimentations <i>in vivo</i>		Non	Non	Oui (2) [autre application]	Oui et Non («pré-validée »)	Non	Non	Oui et Non [autres applications] (6)
ESTOMAC	Pepsine	35-40 U.mL ⁻¹	-	315 U.mL ⁻¹	0,05g.mL ⁻¹	182 U.mg ⁻¹ prot	750 U.mL ⁻¹	9000 U.mL ⁻¹
	Lipase gastrique	-	-	-	-	-	-	60 U.mL ⁻¹
	Minéraux Electrolytes Autres	-	-	-	NaH ₂ PO ₄ ;KCl ; CaCl ₂ ;NH ₄ Cl ;Glucose Acide glucuronique Urée; Glucosamine BSA ; Mucine (4)	NaCl 75 mM	NaCl 17 mM	NaCl 12,5 mM CaCl ₂ 0,6 mM MgCl ₂ 0,3 mM ZnSO ₄ 0,004 mM
DUODENUM INTESTIN GRÊLE	Trypsine	10 U.mL ⁻¹	-	-	-	37.5 U.mg ⁻¹ prot	-	11 U.mL ⁻¹
	Chymotrypsine	-	-	-	-	0.44 U.mg ⁻¹ prot	-	24 U.mL ⁻¹
	Pancréatine	0,005 mg.mL ⁻¹ (8xUSP)	(1)	0,4 mg.mL ⁻¹ (4xUSP) (3)	10 mg.mL ⁻¹ (4xUSP)	-	1g.L ⁻¹ (1 USP)	1,5g.L ⁻¹ (7) NaHCO ₃ 150mM
	Lipase panc.	-	{270;800;1340} U.mL ⁻¹ (1)	-	0,02g.mL ⁻¹	51,2 U.mL ⁻¹ + Colip.2µg.mL ⁻¹	-	590 U.mL ⁻¹ + Colip 3,2µg.mL ⁻¹
	Amylase panc.	-	-	-	290 mg.L ⁻¹	-	-	300 U.mL ⁻¹
	Bile	-	{11-66} mM	2.5 g.L ⁻¹	3 g.L ⁻¹	Taurocholate(Na) 7,4 mM Glycodeoxycholate(Na) 7,4 mM	(5)	(Tout en mM) Lécithine 6,5 ; Cholesterol 4,0 Taurocholate(Na) 12,5 Glycodeoxycholate(Na) 12,5 NaCl 14,6 ; CaCl ₂ 2,6 ; KCl 4,8
	Minéraux Electrolytes Autres	-	CaCl ₂ {1,4-7,2} mM Ttrizma- maléate 2 mM NaCl 150 mM	-	NaCl, NaHCO ₃ KH ₂ PO ₄ , KCl,CaCl ₂ MgCl ₂ , Urée, BSA (4)	Bis-Tris 24,7 mM CaCl ₂ 9,2 mM	NaCl 17 mM	NaCl 8,0 mM CaCl ₂ 0,03 mM NaH ₂ PO ₄ 0,9 mM

U : Unité enzymatique exprimée en $\mu\text{mol}/\text{min}$; USP : Unité définie par la United States Pharmacopeia. Pour chaque catégorie d'enzyme, que l'activité soit exprimée en U ou USP, un protocole de caractérisation standardisé est donné dans la référence associée. Il s'agit bien souvent d'un même protocole spécifique à une classe d'enzyme (lipase, protéases etc.) dont les conditions opératoire fixent, entre autres, la température, le tampon et le substrat.

(1) Dans ce modèle, la lipase pancréatique caractérisée provient de la pancréatine. Une solution mère de pancréatine est préparée et le volume ajouté est différent en fonction de la concentration en lipase voulue (plan d'expérience cherchant à établir l'influence de 3 paramètres sur l'activité lipolytique de l'enzyme)

(2) Méthode adaptée de Schriker et al. 1981, celle-ci ayant été validée *in vivo* (modèle humain et rat) concernant la biodisponibilité du Fer.

(3) « Pré-validation » *in vivo* puisqu'il s'agit de comparaison avec d'autres études chez différents organismes (poulet, rat, porc humain) et non pas d'une validation de la méthode à proprement parler. Détail dans le rapport RIVM report 320102002/2004 (Institut National de la Santé Publique néerlandais), plus exhaustif que l'article (Verstantvoort et al. 2004)

(4) La composition est très élaborée et, dans un souci de simplification, seule la nature des minéraux et électrolytes est donnée dans le tableau, le modèle ayant été jugé trop complexe pour nos essais batch.

(5) Pas de sels biliaries/bile dans cette étude ; les auteurs se réfèrent à une étude précédente dans laquelle les micro-organismes testés ont déjà été évalués selon ce critère (sans exposition préalable au stress gastrique cependant) (Charteris and Kelly 1992; Collins and Thornton 1994)

(6) Ce modèle est à la limite entre le statique et le dynamique puisque seule la partie « Estomac » est en continu, la partie « duodénum » est en batch. Il sera abordé plus en détail dans le paragraphe traitant des modèles dynamique (cf. modèle « DGM ») et est cité ici pour sa reconstitution complexe de la bile.

Concernant la validation *in vivo*, il a été validé pour diverses applications (ex. digestion de capsules pour application pharma, digestion des glucides et index glycémique) mais pas pour des applications probiotiques (Wickham et al. 2012).

Tableau 3 : Comparaison des conditions opératoires de différents modèles de digestion *in vitro* batch

		Parrot et. al (2003)	Zangenberg et al. (2001)	Gil-Izquierdo et al. (2002)	Versantvoort et al. (2005)	Moreno et al. (2005)	Charteris et al. (1998)	Lo Curto et al. (2011)
ESTOMAC	Durée (min)	30		120	120	0 -120	90 ; 180	44
	Température (°C)	37		37	37	37	37	37
	pH	2 (HCl)		2 (HCl)	2-3(HCl)	2,5(HCl)	2(HCl)	1,5-4(HCl)
	Agitation	160 rpm		50 rpm	Retournement	« Modérée »	Non	Non
DUODENUM INTESTIN GRÊLE	Durée (min)	240	40	150	120	0-120	240	60-120
	Température (°C)	37	37	37	37	37	37	37
	pH	7,5 (NaOH)	6,5 (NaOH)	5 (NaHCO ₃)	6,5-7 (NaHCO ₃)	6,5 (NH ₄ HCO ₃)	8 (NaOH)	6,8 (NaHCO ₃)
	Agitation (rpm)	160 rpm	Agitateur magnétique	50 rpm	Retournement	Non	Non	Non
	Autre							N ₂ (élimination O ₂)

Une nouvelle tentative d'harmonisation a été entreprise par le biais du COST Infogest ce qui a conduit à la publication d'un protocole consensus de digestion *in vitro* batch, validé par un groupe d'experts internationaux (Minekus et al., 2014)(Figure 16).

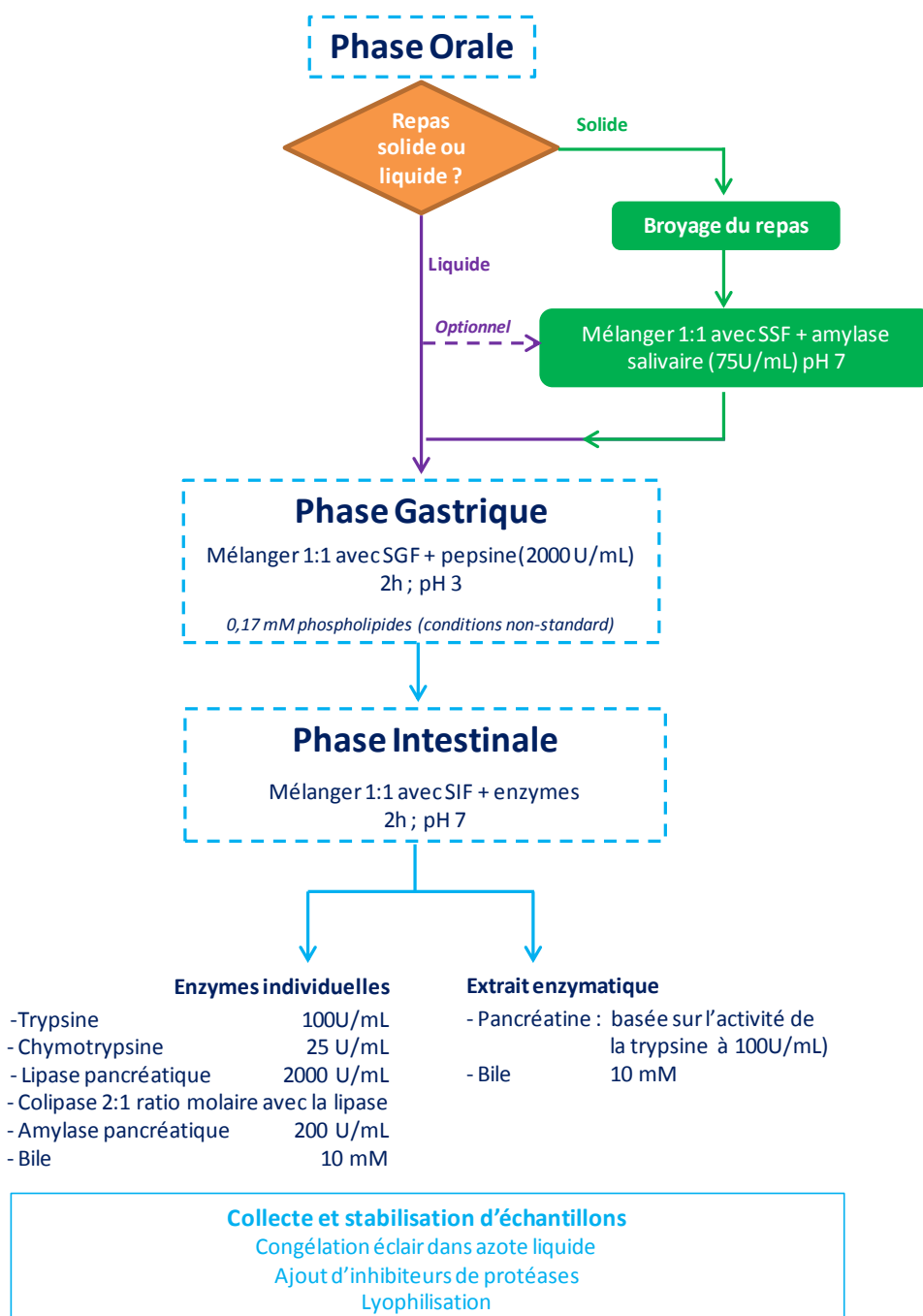


Figure 16 : Schéma de principe récapitulant les étapes du modèle consensus établi par Minekus et al. (2014) dans le cadre du COST Infogest

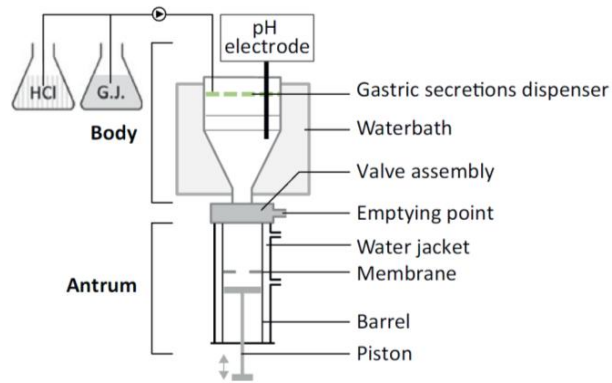
Cette méthode prend en compte des phases (i) de digestion orale (salive), (ii) de digestion gastrique, (iii) de digestion intestinale. Elle ne traite pas du gros intestin et de la fermentation colique (e.g. pas d'ensemencement par un microbiote).

Cet article revêt une forme très technique puisqu'il expose en détail une méthode validée par les experts. Le protocole s'attarde notamment sur le ratio bol alimentaire/fluides digestifs et, par là, sur le ratio bol alimentaire/enzymes, ou encore bol alimentaire/bile, points clés lors de la digestion humaine et qui n'étaient pas toujours traités de manière rigoureuse dans les modèles existants. Il insiste sur un point abordé précédemment dans la revue de Hur et al. (2010) : le choix de pondérer et de faire prévaloir certains paramètres les uns par rapport aux autres est fonction de l'objectif des études et reposent sur les avis d'experts du domaine.

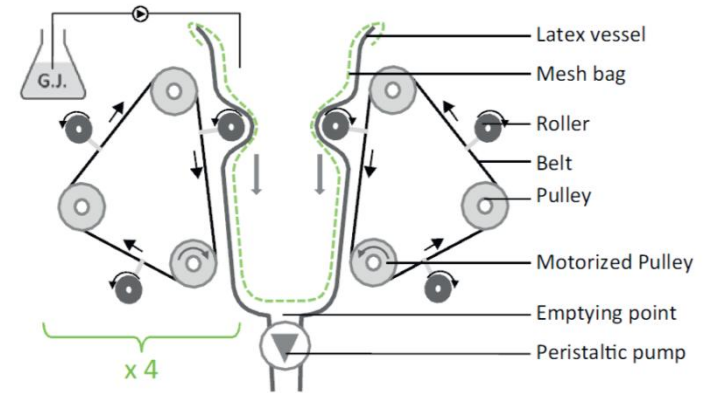
Concernant l'étude de la résistance au stress digestif de micro-organismes, la majorité des travaux utilisent des modèles prenant en compte – *a minima* – (i) toutes les enzymes présentes dans les compartiments estomac et duodénum/intestin grêle (ii) la bile, (iii) le pH acide dans l'estomac et le pH neutre/basique dans le duodénum-intestin.

3.2.2. Modèles de digestion dynamique

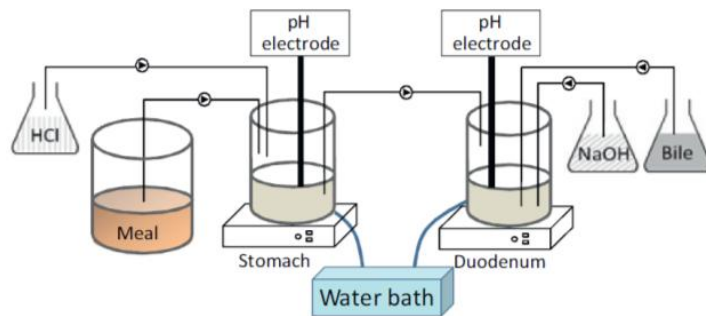
Les modèles « batch » sont donc intéressants afin d'obtenir des informations générales lors des phases préliminaires de travaux. Cependant, ces modèles ne tiennent pas compte de l'aspect cinétique et séquentiel de la digestion, ce qui rend très limitée leur capacité à représenter le processus de digestion dans son ensemble. Il s'agit de trouver un compromis entre fidélité vis-à-vis des mécanismes de la digestion et complexité de mise en place/utilisation du système. Ainsi sont apparus les modèles de digestion *in vitro* dits « dynamiques » qui tentent de combler un certain nombre de manques des modèles batch. La Figure 17 et le Tableau 4 associé, adaptés de la revue de Guerra et al. (2012), présentent une sélection des principaux dispositifs de digestion *in vitro* dynamiques actuellement utilisés. Ces modèles permettent tous de contrôler (i) les cinétiques de pH, (ii) le transfert entre compartiments, (iii) l'agitation du bol ainsi que (iv) la température à laquelle se déroulent les expérimentations (37°C). Les modèles multi-compartimentaux ont en commun de reconstituer séparément chaque étage de la digestion, permettant un meilleur contrôle du ratio bol/sécrétion digestives.



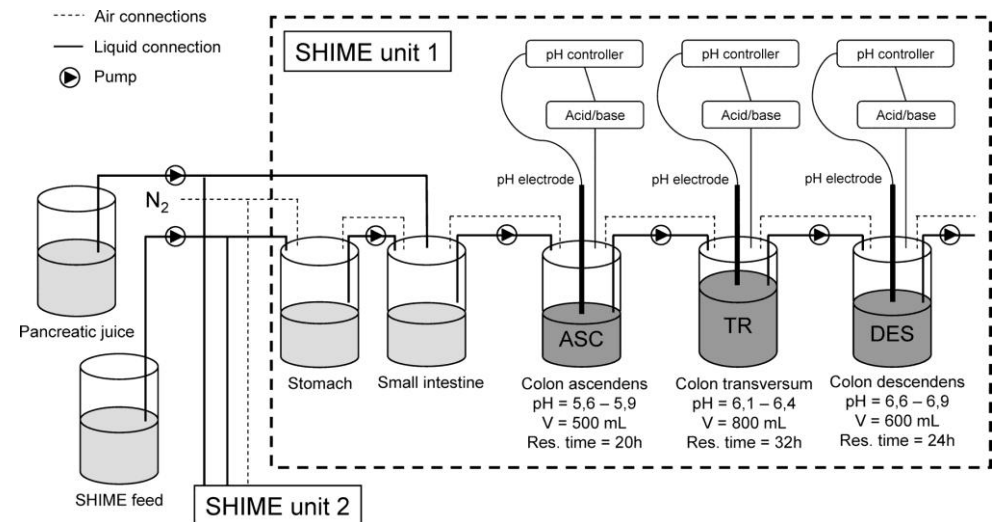
Digester dynamique mono-compartmental « DGM »
(Mercuri et al., 2008 ; Whickam et al. 2012)



Digester dynamique mono-compartmental « Human
Gastric Simulator » ou « HGS » (Kong et al., 2010)

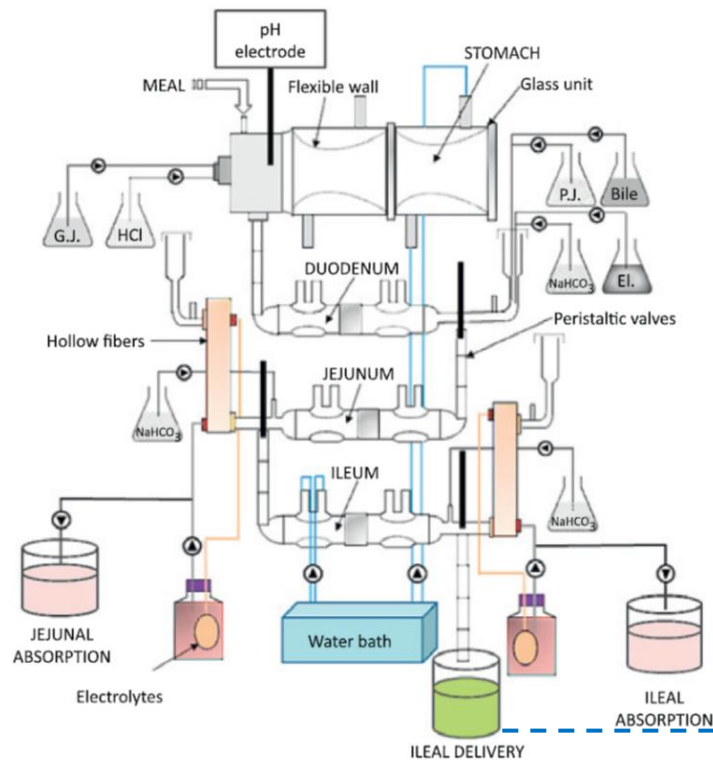


Digester dynamique bi-compartmental
(Mainville et al., 2005)



Digester dynamique multi-compartmental encencencé
« Simulators of the Human Intestinal Microbial Ecosystem » ou « SHIME »
(Molly et al., 1993 ; Van den Abbeele et al., 2010)

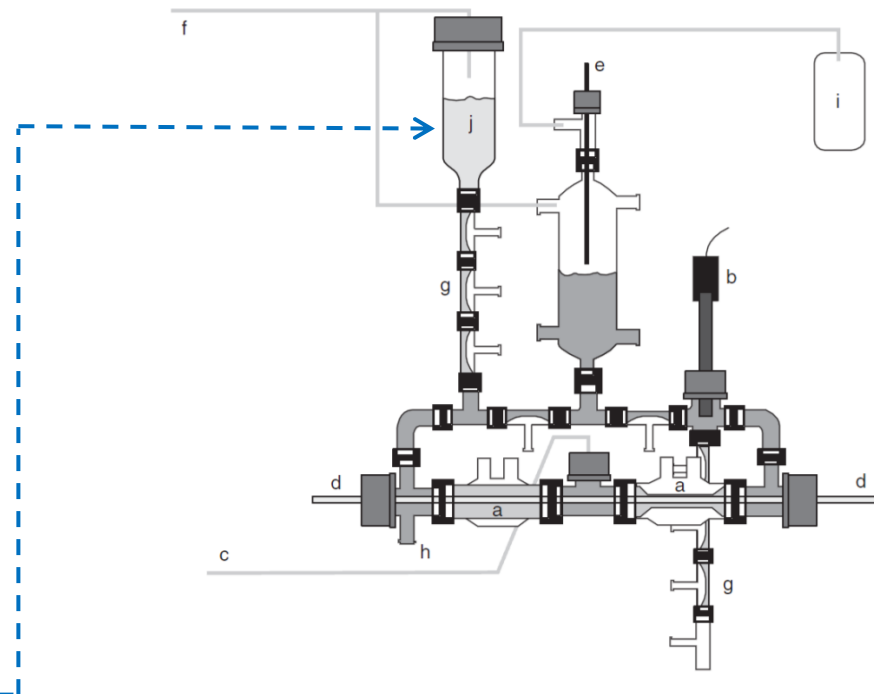
Figure 17 : Schémas des principaux dispositifs de digestion in vitro dynamiques actuellement utilisés (sélection)



Digesteur dynamique multi-compartmental «TIM-1 »

(Minekus et al., 1995)

G.J. : jus gastrique ; P.J. : jus pancréatique



Digesteur dynamique multi-compartmental encemencé «TIM-2 »

(Minekus et al., 1999 ; Venema et al., 2009)

(a) compartiments péristaltiques; (b) électrode de pH; (c) pompe alcalinisantes;
(d) circuit de dialyse à fibres creuses; (e) capteur de niveau; (f) piquage pour arrivée N₂;
(g) valves d'entrée/sortie; (h) point de prélèvement; (i) sortie de gaz; (j) stockage du digestat iléal

Figure 17 (suite) : Schémas des principaux dispositifs de digestion *in vitro* dynamiques actuellement utilisés (sélection)

Tableau 4 : Caractéristiques spécifiques à chacun des modèles de digestion *in vitro* dynamique présentés

Système	Nombre et nature des compartiments	Transit intestinal	Mélange du bol	Absorption intestinale	Microbiote intestinal	Références
DGM	1 Estomac	Non	Pression sur les parois (eau) Piston pour l'évacuation du bol	Non	Non	Mercuri et al., 2008 ; Whickam et al. 2012
HGS	1 Estomac	Non	Système mécanique sur les parois	Non	Non	Kong et al., 2010
Mainville	2 Estomac Duodénum	Oui	Agitateurs magnétiques	Non	Non	Mainville et al., 2005
TIM-1	4 + 2 Estomac Duodénum Jéjunum Iléon Côlon (couplage avec Tim-2)	Oui	Pression sur les parois (eau)	Oui	Oui (association avec TIM-2)	Minekus et al., 1995 ; Minekus et al., 1999
SHIME	2 + 3 Estomac Intestin grêle Colon ascendant Colon transverse Colon descendant	Oui	Agitateur magnétiques	Non	Oui	Molly et al., 1993 ; Van den Abbeele et al., 2010

Bien que ces modèles tendent tous à représenter au mieux la digestion telle qu'elle se passe en réalité, leurs conceptions sont sensiblement différentes. En effet, des simplifications sont nécessaires afin de rendre possible la construction et l'utilisation de ces « machines ». Le Tableau 5 expose les limites de ces systèmes dynamiques ainsi que les pistes d'améliorations envisagées.

De même que pour les modèles « batch », il n'existe pas de consensus, ce qui rend délicate la comparaison des travaux utilisant des dispositifs différents. L'importance de la validation de ces modèles par corrélation avec des expérimentations *in vivo* est donc cruciale. Cette démarche est la plus à même d'attester qu'un jeu de données issu d'un outil approche bien ce qui se passe *in vivo*.

Tableau 5 : Limites et pistes d'amélioration des modèles de digestion *in vitro* dynamiques (sélection)

Limites	Pistes d'améliorations	Modèles présentés tenant compte de ces limitations	Références
Pas de prise en compte de la réponse de l'hôte	Combinaison modèles existants avec cellules intestinales humaines		Payne et al. (2012) Deat et al. (2009)
Pas de modélisation réaliste du péristaltisme et des forces mécaniques intervenant dans la déstructuration du bol	Amélioration de la qualité de l'agitation et prise en compte des contraintes mécaniques agissant sur le bol	DGM & HGS	Kong et al. (2010) Mercuri et al. (2008)
Pas de microbiote intestinal Pas de mucus intestinal	Intégration de la flore résidente dans l'intestin grêle et le côlon	TIM-2 et SHIME (côlon)	Booijink et al. (2010) Bogert et al. (2011) Macierzanka et al. (2014)
Pas de simulation de la partie bouche	Combinaison des modèles existants avec des dispositifs masticatoires		Woda et al. (2010) Anson et al. (2009) Blanquet et al. (2004)
Travaux s'appuyant sur la physiologie d'un adulte en bonne santé	Développement de modèles prenant en compte l'âge ou la pathologie		Blanquet et al. (2004) Dupont et al. (2009) Hawcutt & Smyth (2008) Vermeiren et al. (2011)
Significativité biologique des modèles	Mise en place d'études permettant la corrélation <i>in vitro/in vivo</i>	TIM-1 & 2 SHIME	Souliman et al. (2006) Venema et al. (2009)
Pas de suivi des métabolites produits	Métabolomique et marquage isotopiques des produits de digestion		Egert et al. (2007)

3.3. Bilan

L'étude de la digestion a conduit à la création d'une grande diversité de modèles, qui diffèrent par leur nature (ex. *in vivo*, *in vitro*, batch, dynamique) mais aussi par leurs applications (ex. ciblée sur une classe de molécules ou un compartiment ou prenant en compte l'ensemble du tube digestif et utilisant un bol complexe). Aussi sophistiqués que soient ces modèles, ils ne peuvent décrire une digestion « universelle », celle-ci étant, comme nous l'avons vu dans la section « La Digestion chez l'Homme », un processus sujet à de multiples variations. Cependant, la démarche consistant à construire un plan d'expérimentation ciblé sur une question et utilisant un ou plusieurs modèles de digestion, a permis de faire progresser, de conserver, les modèles en question ainsi que la compréhension des phénomènes se produisant lors du processus de digestion. La grande limite des modèles dynamiques actuels - basés sur une approche très analytique de la digestion - vient du fait qu'ils ne tiennent pas compte des interactions liées aux autres acteurs du système au cœur duquel se place le tube digestif. Une approche plus systémique incluant, par exemple, la régulation hormonale du système digestif ou encore le système nerveux très développé au niveau de l'intestin grêle, pourraient ouvrir des pistes d'améliorations intéressantes concernant ces modèles de digestion. Cependant, la complexité du système nerveux lié au tube digestif ainsi que sa régulation hormonale sont des phénomènes encore peu élucidés ; une meilleure compréhension en serait nécessaire avant d'envisager leur intégration dans un modèle.

De même, la construction de modèles prédictifs *in silico*, basés sur une intégration des données obtenues par différents modèles, est en train de se développer. Ces modèles, déjà bien avancés pour la digestion de molécules ciblées, peinent encore à décrire la digestion dans son ensemble. Ils n'ont pas été abordés dans le cadre de cette revue bibliographique étant donné que le projet de thèse n'incluait pas la création d'un modèle prédictif à partir des données collectées.

4. BACTERIES ALIMENTAIRES ET STRESS DIGESTIF

Les travaux de cette thèse ayant étudié plus en détail la réponse au stress digestif de deux bactéries, la réponse spécifique au stress eucaryote ne sera pas abordée.

4.1. Réponse générale au stress des bactéries

La réponse générale au stress des bactéries leur permet de survivre, dans un environnement dans lequel des facteurs clés liés à leur homéostasie sont fluctuants. En effet, la température, le pH, le potentiel redox, le pH, la présence de molécules toxiques, la présence/absence d'oxygène, la disponibilité des nutriments, entres autres, sont sujets à des variations ayant un impact parfois négatif sur les cellules et celles-ci doivent s'adapter (Requeno et al., 2012).

Cette réponse générale est au cœur d'un système de perception de l'environnement, de circulation de l'information au sein de la cellule, ainsi que de la réponse proprement dite, mise en place pour rétablir un équilibre perturbé. Un stress n'arrivant que rarement seul, ces mécanismes de « sensing » et de réponse interagissent les uns avec les autres.

Parmi les systèmes les plus importants chez les bactéries, on peut citer la famille des « heat-shock protéines » telles que DnaK, GroEL et GroES et leur contrôle par le facteur sigma 32, les « cold-shock proteins », les enzymes luttant contre le stress oxydant telles que la catalase (Kat), ou la superoxyde dismutase (Sod) (Farr et al.1991). La liste de ces protéines, impliquées dans la détection, la réparation et l'éventuelle dégradation des protéines, acides nucléiques ou autres molécules devenues non-fonctionnelles suite à un stress cellulaire, n'est pas exhaustive.

Les travaux de cette thèse s'intéressent à la réponse aux stress rencontrés dans l'estomac, liés en majeure partie au stress acide, ainsi que les stress rencontrés dans le duodénum, liés en majeure partie à la présence de sels biliaires ; les deux prochaines sections aborderont donc les mécanismes généraux décrits à l'heure actuelle concernant ces deux stress majeurs rencontrés par les bactéries lors de leur passage dans le tractus digestif.

4.2. Réponse au stress acide rencontré dans l'estomac

Le stress acide rencontré au sein du tractus digestif est matérialisé par le passage au sein de l'estomac. Comme nous l'avons vu dans la section 2.2.1, le pH peut atteindre des valeurs extrêmes comprises entre 4,5 et 2 au cours de la digestion. Ces conditions sont extrêmement sévères pour les micro-organismes, surtout pour les bactéries d'affinage dont le pH de croissance se situe autour de la neutralité, voire légèrement basique (Bockelman et al. 2002).

Afin de limiter l'acidification du milieu intracellulaire, divers mécanismes ont été décrits. La revue de Krulwich et al. (2011) offre une excellente synthèse de ce qu'à la fois les bactéries à Gram-positif et les bactéries à Gram-négatif peuvent mettre en place pour excréter des protons ou activer des voies métaboliques contribuant à les consommer. La Figure 18 représente l'adaptation du métabolisme d'*Escherichia coli* et de *Streptococcus mutans* à un stress acide. Il apparaît clairement que certaines voies telles que le métabolisme des acides aminés (voie du glutamate), la chaîne respiratoire (Nuo, Cyo, F_1F_0 -ATP synthase) ou encore la fermentation malolactique, sont détournées de leur fonction première afin de permettre une gestion du stress acide, soit par la consommation de protons, soit par leur excrétion directe.

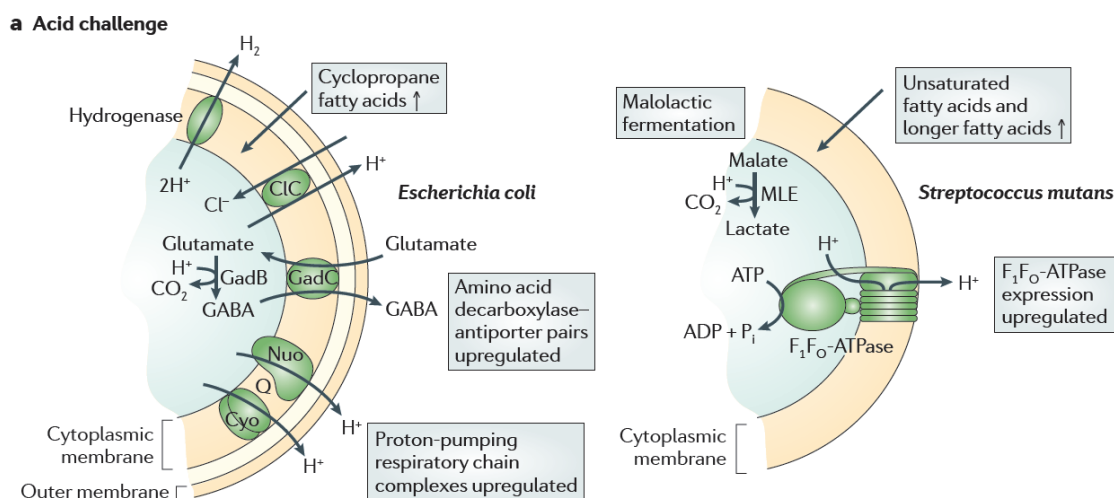


Figure 18 : Exemple d'adaptation de bactéries « neutrophiles » afin de répondre à un stress acide. Adapté de Krulwich et al (2011).

GABA : γ -aminobutyrate ; GadC : glutamate/ Acide γ -aminobutyrate antiporteur ; GadB glutamate decarboxylase- β ; Cyd : cytochrome bd ; Cyo : cytochrome bo ; MLE : malolactic enzyme ; NhaA : Na^+/H^+ antiporteur ; Nuo : NADH-ubiquinone oxidoreductase.

La sur-expression d'enzymes impliquées dans la consommation des protons cytoplasmiques telles que les hydrogénases et les décarboxylases, fait aussi partie des mécanismes de réponse (Kannan et al., 2008 ; Slonczewski et al. 2009). Le métabolisme de l'urée a aussi été démontré comme clé dans l'adaptation aux conditions acides extrêmes telles que celle rencontrées dans l'estomac. La bactérie responsable de certains ulcères gastriques, *Helicobacter pylori*, utilise la capacité de l'uréase à produire de l'ammoniaque et du bicarbonate pour maintenir un pH aux alentours de 6 dans son espace périplasmique alors que les conditions extérieures avoisinent pH 2 (Bauerfeind et al., 1997). Les bactéries peuvent aussi transporter les protons vers le milieu extracellulaire, soit sous forme de dihydrogène par l'intermédiaire d'hydrogénases (Nogushi et al., 2010), soit par l'intermédiaire de transporteurs de cations (symport et/ou antiport) (Hunte et al. 2005).

En plus de mécanismes de réponse à proprement parler, le « sensing » des variations du pH intracellulaire, ainsi que la régulation de ces mécanismes, sont des phénomènes importants. Certains facteurs sigma dont le σ^B ou encore les systèmes à deux composantes (histidine-kinase associée à la membrane couplée à un régulateur cytoplasmique), ont été respectivement décrits chez *Bacillus subtilis* et *Listeria monocytogenes*, comme fortement impliqués dans la réponse au stress acide (Akbar et al., 2001 ; Cotter et al., 1999). La réponse au stress acide étant complexe et assez documentée, nous nous arrêterons ici concernant sa description. Les travaux de cette thèse n'ont en effet pas pour objectif l'étude approfondie de la mécanistique de cette réponse.

4.3. Réponse au stress biliaire rencontré dans le duodénum

La structure des sels biliaires a été abordée dans la section 2.3.1. La réponse à leur exposition chez les bactéries a été très bien décrite dans la revue de Begley et al. (2005). Malgré les 10 ans écoulés depuis cette synthèse, elle reste d'actualité, les mécanismes de réponse au stress biliaire étant encore relativement peu connus. Ces sels biliaires peuvent endommager les membranes des cellules bactériennes, causer des dommages à l'ADN et à l'ARN, une fois rentrés dans le cytoplasme ou encore provoquer un stress oxydatif (Begley et al., 2002 ; Bernstein et al., 1999). En effet, les sels biliaires non-conjugués (fortement hydrophobes) peuvent diffuser passivement à travers la membrane. Les sels biliaires conjugués sont ionisés au pH physiologique et ne rentrent dans la cellule que si un transporteur peut les prendre en charge (Begley et al., 2005).

Les bactéries présentes dans le tractus digestif sont attendues comme résistantes, à des degrés variables, aux sels biliaires. En effet, ces bactéries doivent toutes supporter une concentration minimale en sels biliaires. Cependant, certaines souches de *Salmonella typhimurium* peuvent aller jusqu'à coloniser la vésicule biliaire, dans laquelle la bile est stockée et donc très concentrée (Prouty et al., 2002). L'adaptation à cette présence de sels biliaires est assez difficile à généraliser puisqu'elle semble très différente d'une espèce à l'autre, voire au sein d'une même espèce (souche-dépendance) (Begley et al., 2005). Chez les bactéries à Gram-négatif, le lipopolysaccharide (LPS) semble impliqué dans certaines formes de résistance (Prouty et al., 2002). Les systèmes de pompes à efflux appartenant à la famille des « Multi-Drug Resistance » protéines sont cités chez les bactéries à Gram-négatif (ex. EmrAB, et AcrAB chez *E. coli* et *S. typhimurium*) (Lacroix et al. 1996, Begley et al. 2005). La « bile salt hydrolase », enzyme capable de déconjuguer les sels biliaires et de limiter leur toxicité tout en facilitant leur export de la cellule, a été décrite chez des lactobacilles probiotiques (Ramasamy et al. 2009). Toujours chez les bactéries à Gram-positif, Leverrier et al. (2003) ont mis en évidence la capacité de certaines souches de *Propionibacterium freudenreichii* à réagir au stress biliaire en sur-exprimant certaines protéines impliquées dans la transduction du signal et la réponse générale au stress. Il est intéressant de noter que les travaux de Leverrier et al. (2003) ainsi que ceux de Flahaut et al. (1996) (concernant, quant à eux, *Enterococcus faecalis*), ont montré qu'une exposition préalable à un stress acide ne protégeait pas nécessairement d'un stress biliaire ultérieur – i.e. pas de « cross-adaptation » –, voire, pouvait conduire à une sensibilisation du micro-organisme.

D'une manière générale, la résistance de micro-organismes pathogènes ou probiotiques a été évaluée en cultivant ces micro-organismes dans des milieux contenant des sels biliaires et en analysant la survie de certaines souches « locus-disruptées » pour certaines fonctions (exemple de *L. monocytogenes* chez Begley et al., 2002), mais la compréhension des mécanismes sous-tendant cette résistance restent mal-connus.

4.4. Matrice fromagère et résistance au stress digestif

Comme nous l'avons déjà évoqué, très peu de travaux se sont intéressés à la résistance au stress digestif de micro-organismes fromagers et, à notre connaissance, aucune étude n'a cherché à caractériser précisément la réponse moléculaire et physiologique de micro-organismes d'affinage. Les travaux identifiés de Lay et al. (2004) et Firmesse et al. (2008) concernent le Camembert et ont surtout caractérisé la réponse de l'hôte. Des micro-organismes, seul le dénombrement a servi à avoir une image de la résistance au stress digestif, par leur capacité à parvenir viables dans les fèces de modèles murins ou de volontaires humains. Cependant, depuis la fin des années 90, le fromage est devenu un vecteur intéressant pour les micro-organismes probiotiques. En effet, le Cheddar (Gardiner et al. 1999) ou encore le Cottage cheese, le Gouda, le Ras et d'autres fromages ont été envisagés comme « véhicule » pour les probiotiques et ce pour plusieurs raisons (Ouwehand et al., 2010).

En comparaison d'autres matrices laitières vectrices comme le lait fermenté, l'acidité du fromage est réduite et sa teneur en matière grasse et en protéines plus élevée, pourrait offrir une protection supplémentaire aux micro-organismes lors du passage dans le tractus digestif (Saxelin et al., 2010) notamment par le pouvoir tampon élevé du fromage, du fait de sa teneur importante en protéines et en peptides (Gardiner et al., 1998 ; Upreti et al., 2006). Des études ont notamment démontré une meilleure survie à des conditions gastriques de probiotiques tels que la bactérie à Gram-positif *Enterococcus faecium* (Gardiner et al., 1999) et de *Lactobacillus casei* (Sharp et al., 2008) incorporés dans un cheddar, en comparaison avec un lait fermenté.

Ainsi, les micro-organismes d'affinage du fromage pourraient, eux aussi, bénéficier à la fois de la présence mais aussi de la croissance au sein de cet environnement annoncé comme potentiellement protecteur.

4.5. Conclusion

La majeure partie des travaux présentés évoqués dans cette synthèse s'intéressent aux micro-organismes probiotiques (bifidobactéries et bactéries lactiques essentiellement), ainsi qu'aux micro-organismes pathogènes appartenant, pour la plupart, au genre *Listeria* ou à la famille des Enterobactéries. Les micro-organismes d'affinage, exception faite des starters lactiques et de quelques entérobactéries telles qu'*Hafnia alvei*, sont issus de *phyla* divers aux caractéristiques génétiques et phénotypiques parfois éloignées. Ainsi, la comparaison entre la littérature et les résultats obtenus concernant les bactéries fromagères sera riche d'informations nouvelles, tout en présentant un défi important.

5. MICRO-ORGANISMES ALIMENTAIRES ET IMMUNOMODULATION

5.1. Pourquoi considérer les micro-organismes d'origine fromagère d'un point de vue immunomodulateur?

Lorsqu'un micro-organisme alimentaire survie au transit digestif, il est en contact avec l'épithélium digestif ainsi qu'avec le microbiote intestinal et les interactions qui résultent de cette rencontre peuvent revêtir différents aspects. Les conséquences bénéfiques de ces interactions hôte/micro-organismes sont à la base de ce que l'on nomme « micro-organismes probiotiques ». La définition conjointe FAO/WHO (2002) du probiotique est la suivante : « un microorganisme vivant qui, lorsqu'il est consommé en quantité adéquate, confère un bénéfice pour la santé de l'hôte ».

Ainsi, sans prétendre qualifier les micro-organismes provenant du microbiote fromager de probiotique, adopter une démarche de caractérisation d'un ensemble réduit de souches d'origine fromagère selon les critères conjoints de viabilité et d'effet santé est une démarche que nous avons jugée pertinente.

5.2. Place de l'immunomodulation dans l'ensemble des interactions potentielles entre micro-organismes alimentaires et hôte

Dans le cadre de cette première étude, parmi les différents effets que peuvent avoir les micro-organismes alimentaires sur l'hôte, nous avons fait le choix de nous concentrer sur l'immunomodulation. Plus particulièrement sur (i) la stimulation de la réponse immunitaire innée par l'intermédiaire des cellules dendritiques et (ii) le « contrôle » des maladies chroniques inflammatoires de l'intestin. La Figure 19, adaptée de la revue de Parvez et al. (2006) expose la place de l'immunomodulation au sein de l'ensemble des phénomènes décrits dans la littérature concernant les probiotiques.

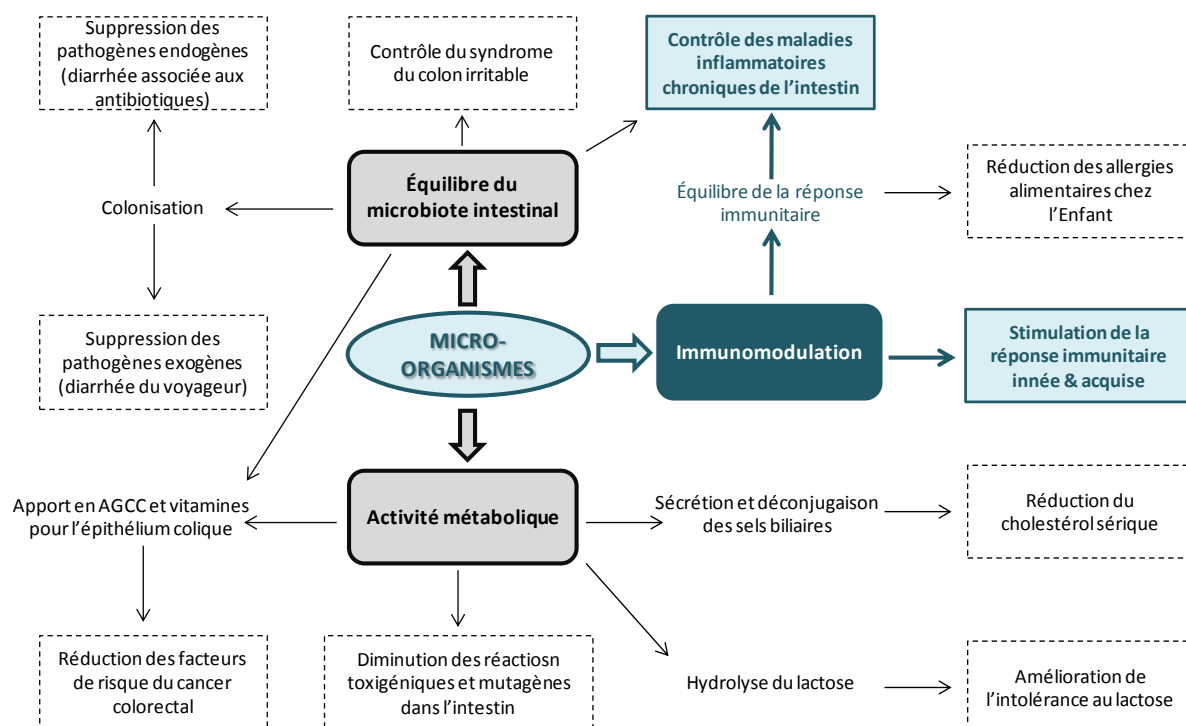


Figure 19: Schéma récapitulatif représentant les mécanismes d'action et cibles pathologiques potentiels de micro-organismes, initialement établi pour les probiotiques. Modifié d'après (Parvez et al., 2006).

En **bleu** : les mécanismes d'immunomodulation qui seront ciblés au cours de ces travaux de thèse. AGCC : Acides Gras volatils à Courtes Chaines

5.3. Immunomodulation : définition et mécanismes

Les mécanismes qui sous-tendent la réponse immunitaire globale sont complexes, notamment lors de la rencontre entre le système immunitaire et un organisme exogène tels qu'un micro-organisme alimentaire par exemple. Si l'on conserve l'exemple des probiotiques, un de leurs moyens d'exercer un effet bénéfique serait de promouvoir les mécanismes de défense de l'hôte afin d'assurer une protection efficace contre les pathogènes tout en maintenant une tolérance orale active envers les antigènes alimentaires et les bactéries endogènes constitutives du microbiote.

Brièvement, la réponse immunitaire est divisée en deux grandes catégories, présentées comme suit dans la revue de Pot et al. (2013) :

- La réponse immunitaire innée, de type inflammatoire, caractérisée par une action rapide et non spécialisée de cellules essentiellement phagocytaires (ex. macrophages, neutrophiles) dont l'objectif est de supprimer l'agent extérieur identifié comme pathogène. Cette réponse ne sera pas abordée dans cette synthèse puisqu'elle ne sera pas étudiée dans les modèles choisis lors de cette thèse.

- La réponse immunitaire acquise ou adaptative, ciblée sur un pathogène ou une classe de pathogène, après une première mise en contact du pathogène (ou tout du moins de certaines parties caractéristiques de celui-ci) avec les lymphocytes T et B assurant cette réponse spécifique.

Au niveau de l'épithélium intestinal, les cellules dendritiques (DCs) sont les messagers de cette réponse adaptative puisqu'elles possèdent la capacité d'assurer la médiation entre les micro-organismes exogènes et les cellules de la réponse immunitaire adaptative. Leur rôle clé dans la reconnaissance et la mise en place de cette cascade de réponses immunomodulatrices, ainsi que leur lien avec certaines pathologies inflammatoires chroniques de l'intestin ont été discuté par Foligné et al. (2007a). La Figure 20, adaptée de la revue de Lebeer et al. (2010), présente les deux manières dont les cellules dendritiques peuvent entrer en contact avec un organisme exogène (ici un probiotique).

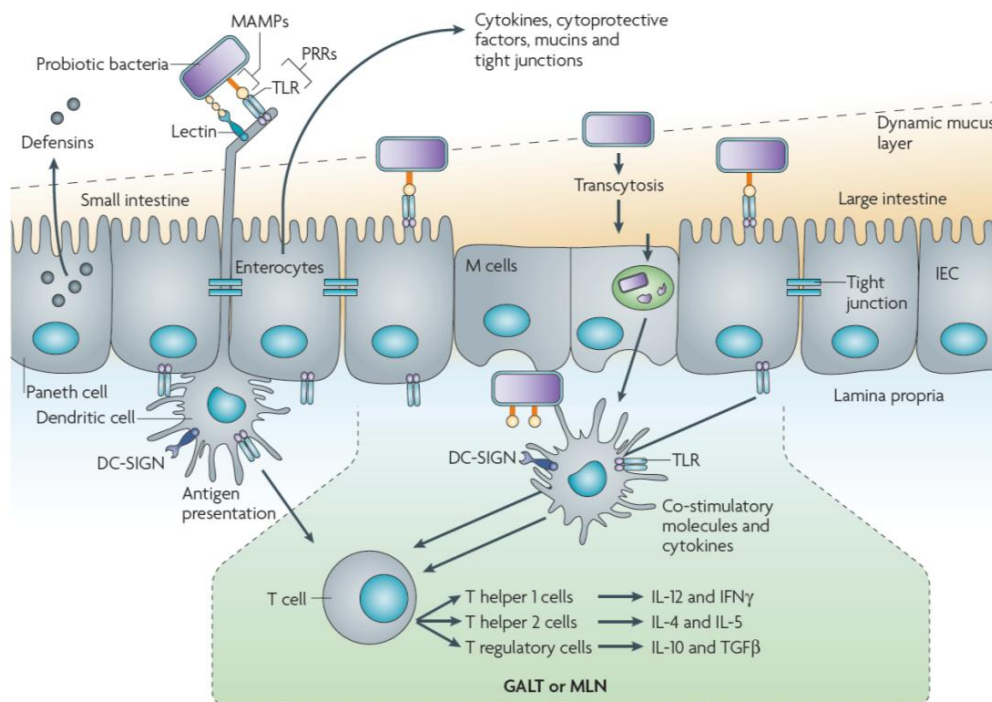


Figure 20 : Interaction entre une bactérie probiotique (ou un micro-organisme alimentaire) et (i) des cellules de l'épithélium intestinal (IECs) ou (ii) des cellules dendritiques(DCs) du système lymphoïde associé au tractus digestif (GALT). D'après Lebeer et al. 2010

IL : interleukine ; MAMPs : microbe-associated molecular pattern ; TLR : Toll-like receptor .

Les cellules de l'épithélium intestinal, elles-mêmes en contact direct avec les micro-organismes alimentaires, peuvent servir d'intermédiaires. En effet, en se liant aux récepteurs de reconnaissance des motifs microbiens (Toll-like receptor, TLR) exprimés en surface des cellules épithéliales (ICEs) et des cellules immunitaires, les micro-organismes alimentaires peuvent potentiellement induire une cascade de mécanismes de réponses immunitaires en stimulant la production de cytokines pro- et/ou anti-inflammatoires. Cette reconnaissance des micro-organismes exogènes par l'hôte s'effectue majoritairement grâce à la présence de motifs en surface des cellules extérieures à l'organisme (MAMPs). Schématiquement, les cellules dendritiques aident ensuite à la mise en place d'une réponse adaptée au micro-organisme ceci conduisant – entre autre – à la production de molécules caractéristiques d'une réponse plutôt anti-inflammatoire comme l'interleukine 10 (IL-10) ou d'une réponse plutôt pro-inflammatoire comme l'IL-12, le Tumor Necrosis Factor alpha (TNF α) ou l'interféron gamma (INF γ).

De plus, certains micro-organismes peuvent aussi agir *via* leur interaction avec l'épithélium digestif par exemple en adhérant à la muqueuse ou aux cellules épithéliales, en stimulant la sécrétion de mucus ou le relargage de molécules défensives comme les mucines, en augmentant et renforçant la barrière épithéliale, ou encore en améliorant la motilité intestinale. Les bactéries du microbiote contribuent au maintien de la barrière intestinale, qui peut être modifiée par la présence de bactéries extérieures, favorisant alors leur passage à travers la muqueuse intestinale (Fioramonti et al., 2003). Il a été montré que certains probiotiques produisent des métabolites qui modifient directement la perméabilité épithéliale et renforcent l'intégrité de la barrière *in vitro* (Madsen et al., 2001) et *ex vivo* (Isolauri et al., 1993). Ces effets sont particulièrement importants dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) comme la rectocolite hémorragique ou la maladie de Crohn.

5.4. Description de l'approche adoptée dans ces travaux de thèse

Afin d'étudier cette réponse immunomodulatrice, une démarche associant modèles *in vitro* et *in vivo* a été développée et validée par Foligné et al. (2007b). Le constat que les cellules dendritiques et autres monocytes ont un rôle central dans la médiation de la réponse immunomodulatrice (Foligné et al., 2007a) a conduit à l'utilisation de cellules sanguines dites « Peripheral Blood Mononuclear Cells » (PBMCs) comme moyen de screening des micro-organismes basé sur leur capacité à induire un certain nombre de cytokines caractéristiques d'une réponse au caractère plutôt anti- (IL-10) ou pro-inflammatoire (IL-12, INF γ et TNF α). Ces profils d'induction de cytokines sont ensuite comparés à la capacité d'induction de souches bactériennes de références dont le profil pro-ou anti-inflammatoire a été préalablement établi. Le ratio d'induction IL-10/IL-12 a notamment été retenu

comme marqueur intéressant. Plus un micro-organisme possède un ratio IL-10/IL-12 élevé, plus son potentiel anti-inflammatoire *in vivo* est *a priori* favorable et sa sélection pour de futures expérimentations *in vivo* semble judicieuse.

Ce modèle *in vitro* a été associé à un modèle murin de colite induite à l'acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique (2,4,6-Trinitrobenzene-sulfonic acid (TNBS)). La présence de trois radicaux sulfoxide (SO₂) sur cette molécule (Figure 21) la rend capable d'induire une réaction inflammatoire aigüe lorsqu'administrée localement (*i.e.* instillation-colorectale).

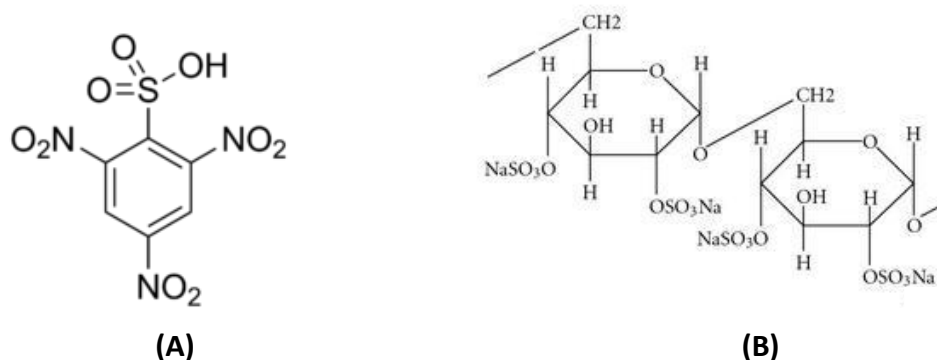


Figure 21 : Formules semi-développées du (A) 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) et du (B) Dextran sulfate sodium (DSS). Ces molécules induisent une réponse inflammatoire colique respectivement aigüe lorsqu'injectée localement (TNBS) et plus progressive lorsqu'administrée par voie orale (DSS).

La cohérence entre profil de cytokines induites lors de l'utilisation du modèle *in vitro* PBMCs et la réponse obtenue lors de l'utilisation du modèle *in vivo* de colite induite au TNBS nous a conduit à choisir ces deux modèles afin d'effectuer une première caractérisation relativement élaborée des micro-organismes sélectionnés pour le projet de thèse. Par ailleurs, un autre modèle de colite employant le Sulfate de Sodium Dextran (Dextran Sulfate Sodium (DSS)) (Figure 21) et dont les mécanismes d'action (type de réponse immune associée, composante épithéliale, localisation sur le tractus digestif) et le mode d'administration (voie orale) sont différents, sera aussi utilisé afin de ne pas disposer seulement d'un modèle unique de colite.

Objectifs et Stratégie

La consommation de fromage induit l'ingestion d'une quantité et d'une diversité de micro-organismes importante. Cependant, les études et données disponibles concernant l'impact de cette consommation sur l'Homme sont loin de recouvrir l'ensemble de cette diversité. A date, l'essentiel des études menées sur l'effet « santé » que peuvent avoir les micro-organismes présents dans les produits laitiers ont consisté, soit à identifier de nouveaux candidats probiotiques appartenant majoritairement à la famille des bactéries lactiques, soit à lutter contre les micro-organismes pathogènes qui entrent dans l'Organisme lors de l'ingestion de produits laitiers. Le fromage, en tant qu'aliment, n'a été étudié presque exclusivement qu'en tant que vecteur d'organismes afin de protéger des micro-organismes probiotiques jusqu'à leur site d'action, bien souvent le côlon. Quelques études ciblées sur les flores d'affinage ont permis d'identifier que ces micro-organismes peuvent transiter au sein du système digestif et arriver viables au niveau du côlon.

Cependant, aucune démarche n'a encore cherché à caractériser la réponse au stress digestif de micro-organismes technologiques couramment utilisés dans l'affinage des fromages. De même, leur potentiel effet sur l'immunomodulation intestinale n'avait été étudié avant les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit. L'objectif de cette thèse était donc d'obtenir des informations liées à ces aspects ainsi que de commencer à comprendre le lien qu'il pouvait exister entre biodiversité et réponse immunomodulatrice.

Pour cela, le travail a été divisé en 5 étapes comprenant chacune l'apport de nouveaux éléments méthodologiques, soit dans leur réalisation, soit dans leur application :

(i) caractériser une sélection de micro-organismes – procaryotes et eucaryotes - représentatifs d'un écosystème de fromage à pâte molle du point de vue de leur capacité à induire une réponse immunomodulatrice. La corrélation entre réponse *in vitro* des cellules PBMCs et les modèles *in vivo* de colites TNBS a été établie : cette démarche n'a cependant jamais été utilisée avec des mélanges de micro-organismes procaryotes et eucaryotes.

(ii) développer une méthode afin de déterminer la capacité (ou non) de ces micro-organismes à résister au stress digestif. Une importante variété de modèles *in vitro* batch et dynamique existe, mais pour les raisons évoquées dans la synthèse bibliographique, il n'y a pas actuellement de méthode « standard ». Des éléments de validation *in vivo* des résultats sont également intégrés à cette étape.

(iii) développer un modèle fromager permettant de mettre en évidence une éventuelle modification de cette capacité de survie aux stress digestifs après une croissance en condition d'affinage réel. La manipulation de ces deux écosystèmes spécifiques n'a jamais été effectuée avant ces travaux.

(iv) tester deux écosystèmes aux profils immunomodulateurs opposés sur deux modèles de colites murins et déterminer si un effet protecteur peut-être observé. Les modèles murins de colites TNBS et DSS n'ont jamais été utilisés pour tester l'influence d'écosystèmes fromagers complets sur des processus inflammatoires.

(v) poser les premiers jalons d'une étude plus fine de la réponse au stress digestif de deux micro-organismes grâce à des outils moléculaires. La réponse au stress digestif de micro-organismes d'affinage n'a jamais été étudiée d'un point de vue moléculaire.

La stratégie adoptée se trouve ainsi à l'interface de l'*in vitro* et de l'*in vivo*, et ce à la fois lors de l'étude de la résistance au stress, mais aussi concernant le potentiel immunomodulateur des micro-organismes sélectionnés.

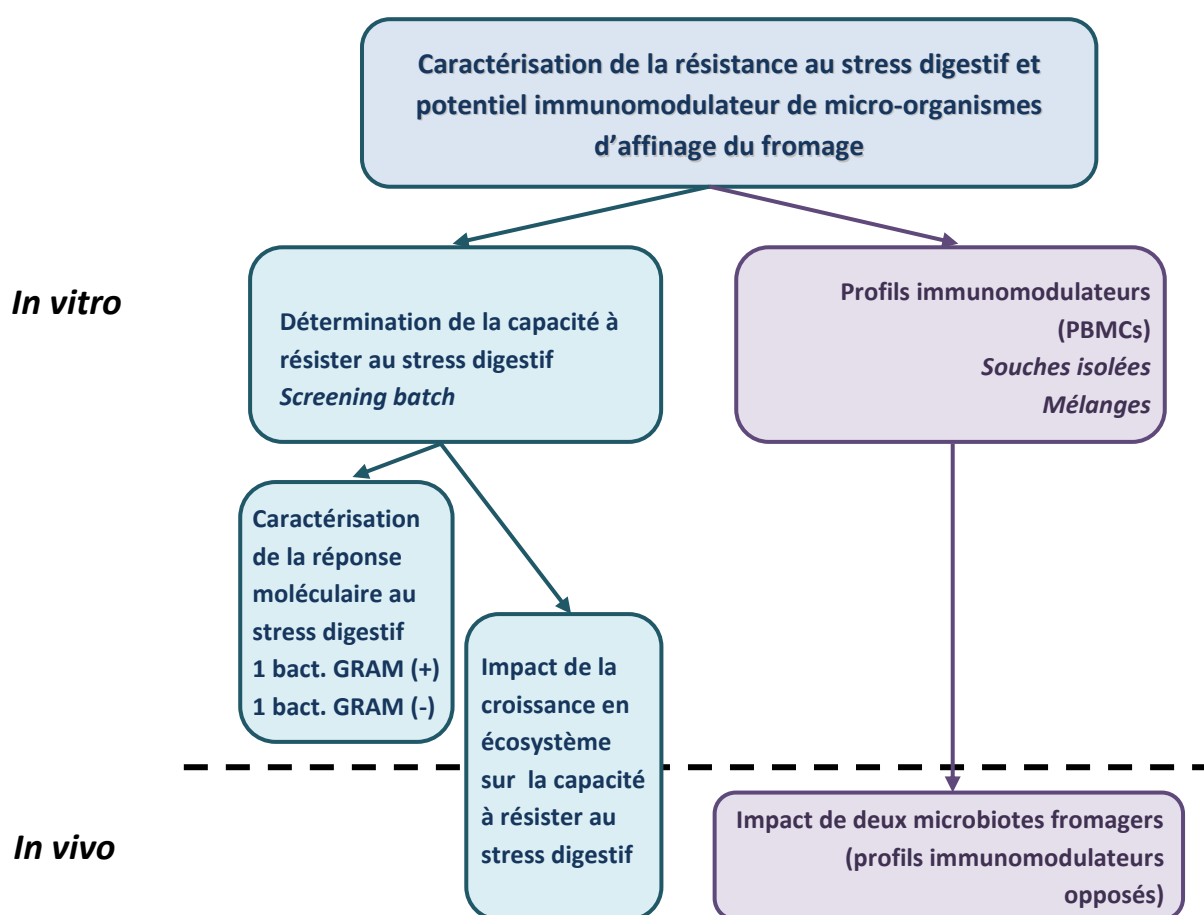


Figure 22 : Diagramme représentant la stratégie générale adoptée au cours de ce travail de thèse

Résultats

- & -

Discussion

Table des matières : Résultats et Discussion

Chapitre 1 : Caractérisation d'une sélection de micro-organismes issus d'écosystèmes fromagers au regard de leur survie à un stress digestif *in vitro* et de leur effet immunomodulateur *in vitro*. 65

1. Présentation de l'article 1 accepté dans *International Journal of Food Microbiology*..... 65
2. Faits marquants 66
3. Résultats marquants et conclusion 95

Chapitre 2 : Impact de la croissance en écosystème sur la résistance au stress *in vitro* de micro-organismes fromagers et comparaison avec les conditions de croissance de laboratoire..... 96

1. Présentation de l'article 2 accepté avec révisions dans *Food Microbiology* 96
2. Faits marquants 97
3. Résultats marquants..... 126

Chapitre 3 : Etude de l'effet immunomodulateur de deux fromages aux profils opposés dans deux modèles de colites murins..... 127

1. Présentation de l'article publié dans *Journal of Functional Foods* 127
2. Faits marquants 129
3. Résultats marquants..... 154

Chapitre 4 : Caractérisation de la réponse au stress digestif *in vitro* « batch » d'une bactérie à Gram-négatif et d'une bactérie à Gram-positif par des outils moléculaires..... 155

1. Présentation de l'article 4 en construction 155
2. Faits marquants 156
3. Résultats marquants et traitement en cours 188

Chapitre 1 : Caractérisation d'une sélection de micro-organismes issus d'écosystèmes fromagers au regard de leur survie à un stress digestif *in vitro* et de leur effet immunomodulateur *in vitro*.

1. Présentation de l'article 1 accepté dans *International Journal of Food Microbiology*

Le double objectif de cette partie des travaux était de mettre au point (i) une méthode de digestion *in vitro* statique permettant le screening d'un nombre important de micro-organismes quant à leur capacité de survie à un stress digestif simulé et (ii) une méthode basée sur une technique immunologique *in vitro* afin d'obtenir un profilage de ces mêmes micro-organismes quant à leur caractère plutôt pro- ou anti-inflammatoire.

En effet, le grand nombre de modèles de digestion *in vitro* présents dans la littérature et leur design bien souvent lié à la nature de la matrice alimentaire à laquelle ils s'intéressent, a nécessité une analyse pointue de la littérature. La revue de Hur et al. (2010) a servi de base à cette analyse et a été complétée par un listing minutieux des conditions de digestion *in vitro* de manière à trouver un compromis entre des modèles expérimentaux parfois très différents. La difficulté à comparer des études réalisées dans des conditions parfois peu comparables, a fait émerger la nécessité d'établir un protocole qui fasse consensus parmi une communauté de scientifiques dont les objets d'étude sont parfois très variés. Pour cela, des consortia tels que le COST Infogest³ ont été formés et celui-ci, en particulier, a abouti à une publication très récente dans le journal « Food and Function » (Minekus et al., 2014). L'équipe ADP, dont je dépends, a participé à l'élaboration de cet article. Ainsi la méthode de digestion *in vitro* que nous avons choisie d'adopter est en grande partie en adéquation avec les propositions d'Infogest. Elle se compose de deux compartiments : un estomac et un duodénum. Nous avons choisi d'exposer les micro-organismes à (i) un stress estomac, (ii) un stress duodénum et (iii) un stress estomac suivi d'un stress duodénum, afin de mettre en évidence lequel de ces deux stress (estomac ou duodénum) avait l'impact le plus important sur la viabilité des bactéries et levures testées. Les micro-organismes identifiés comme sensibles à l'un et/ou à l'autre de ces stress ont ensuite été inclus dans un gel présumé, afin de mettre en évidence un éventuel effet protecteur de la présence d'une matrice laitière.

³ <https://www.cost-infogest.eu/ABOUT-Infogest>

Les micro-organismes choisis étaient au nombre de trente-six (vingt-et-une bactéries, douze levures et trois champignons filamenteux). Parmi ces trente-six micro-organismes se trouvent des espèces dont la diversité potentielle de réponse a été évaluée en sélectionnant deux à trois souches par espèces. *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Escherichia coli* Nissle 1917 et *Saccharomyces boulardii* utilisés comme probiotiques ont été choisis comme micro-organismes de référence.

La détermination du profil immunomodulateur des micro-organismes a fait appel à une technique éprouvée et reconnue, basée sur la réponse de cellules immunocompétentes – les Peripheral Blood Mononuclear Cells – isolées de différents donneurs humains (Foligné et al., 2007). Elle permet de classer les micro-organismes selon leur capacité à induire différents types de cytokines identifiées comme marqueurs d'une réponse plutôt pro- ou plutôt anti-inflammatoire.

Cet article a permis d'obtenir une caractérisation générale des micro-organismes choisis avant de procéder à (i) une étape de digestion toujours *in vitro* mais cette fois-ci dynamique, (ii) de procéder aux premières expérimentations *in vivo* en modèle murin et enfin (iii) de designer des écosystèmes aux profils immunomodulateurs *a priori* différents, basés sur les profils des souches individuelles.

2. Faits marquants

- ✓ Nous avons développé une méthode de digestion *in vitro* statique en deux étapes.
- ✓ Nous avons caractérisé le potentiel immunomodulateur *in vitro* de micro-organismes fromagers.
- ✓ Les bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif ont différencié par leurs réponses.
- ✓ La majorité des levures ont donné des profils immunomodulateur similaires.
- ✓ L'inclusion en gel présure a protégé du stress gastrique.

***In vitro* characterization of the digestive stress response and immunomodulatory properties of microorganisms isolated from smear-ripened cheese**

Nadège Adouard^{ab}, Benoît Foligné^c Joëlle Dewulf^c Marielle Bouix^a, Daniel Picque^b, **Pascal Bonnarme^{*b}**

^a AgroParisTech, Centre de Biotechnologies Agroindustrielles, AgroParisTech INRA, UMR 782 Genie & Microbiologie des Procédés Alimentaires, F-78850 Thiverval Grignon, France

^b INRA, Centre de Biotechnologies Agroindustrielles, AgroParisTech INRA, UMR 782 Genie & Microbiologie des Procédés Alimentaires, F-78850 Thiverval Grignon, France

^c Institut Pasteur de Lille, Lactic acid Bacteria & Mucosal Immunity, Center for Infection and Immunity of Lille UMR 8204, 1, rue du Pr Calmette, BP 245, F-59019 Lille

***Corresponding author pascal.bonnarme@grignon.inra.fr** Phone: +33 130 815 388

Abstract

Thirty-six microorganisms (twenty-one bacteria, twelve yeasts and three fungi) were isolated from surface-ripened cheeses and subjected to *in vitro* digestive stress. The approach mimicked gastric and/or duodenal digestion. *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Escherichia coli* Nissle 1917 and *Saccharomyces boulardii* were used as reference strains. We studied the microorganisms grown separately in culture medium and then included (or not) in a rennet gel. The microorganisms' immunomodulatory abilities were also assessed by profiling cytokine induction in human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). The loss of viability was less than 1 log CFU/mL for yeasts under all conditions. In contrast, Gram-negative bacteria survived gastric and/or duodenal stress well but most of the Gram-positive bacteria were more sensitive (especially to gastric stress). Inclusion of sensitive Gram-positive bacteria in rennet gel dramatically improved gastric survival, when compared with a non-included cultured (with a 4 log CFU/mL change in survival). However, the rennet gel did not protect the bacteria against duodenal stress. The PBMC cytokine assays tests showed that the response to yeasts was usually anti-inflammatory, whereas the response to bacteria varied from one strain to another.

Highlights

- ✓ We performed a two-step, *in vitro* batch digestive stress experiment.
- ✓ We tested the immunomodulatory properties of microorganisms isolated from cheeses.
- ✓ Gram-positive and Gram-negative bacteria differed in their resistance to digestive challenge.
- ✓ All yeast species had very similar immunomodulatory profiles.
- ✓ Rennet gel inclusion protected bacteria against gastric challenge.

Keywords

Smear-ripened cheese microbiota, peripheral blood mononuclear cell, immunomodulation, *in vitro* digestive model, digestive stress.

1. Introduction

Cheese is one of the oldest ways of conserving milk: in Northern Europe, evidence of cheese-making activity has been found at sites dating from the sixth millennium BC (Salque *et al.* 2012).

At present, Europe produces around 9000 thousand tons of cheese per annum (Eurostat, 2013), and Europeans eat between 25 and 30 kg of cheese per capita per annum. Given that a gram of cheese contains 10^8 to 10^9 live microorganisms on average (Beresford *et al.* 2001), the annual intake of viable cells can be estimated at 10^{13} to 10^{14} per capita per annum. The complexity of microbiota depends on the type of cheese. In Cheddar and mozzarella, the microbiota is relatively simple and consists mainly of lactic acid bacteria (LAB) and a few species of yeast (Kindstedt *et al.* 2004; Lawrence *et al.* 2004). In contrast, the microbiota in soft, smear-ripened cheeses (such as Livarot and Munster) contains a broad, diverse range of bacteria and yeasts (Irlinger and Mounier, 2009). Thus, a fermented food product like cheese is an important, diverse source of microorganisms in the human diet. However, few studies have investigated the survival of the cheese microbiota in the gastrointestinal tract. A review of the literature shows that most of the research in this field has focused on Lactobacilli, Bifidobacteria and Propionibacteria (Cousin *et al.* 2011, Saarela *et al.* 2000), with a view to finding new probiotics or using cheese as a carrier for known probiotics (Saxelin *et al.* 2010). Indeed, cheese and (more generally) dairy matrices are often referred to as good vehicles for microorganisms, given their buffer properties and the physical barrier against digestive stress that they may provide (Lollo *et al.* 2012, Salaun *et al.*, 2005, Sharp *et al.*, 2008). One of the few studies related to cheese-ripening bacteria found that the genus *Corynebacterium* survived passage through the gastrointestinal tract in human microbiota-associated rats (Lay *et al.* 2004). Likewise, cheese-ripening yeasts (such as *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis* and *Geotrichum candidum*) were able to survive *in vitro* challenges with acid and bile (Kumura *et al.* 2004, Lay *et al.* 2004, Psomas *et al.* 2001).

It is widely acknowledged that the intake of food-grade microorganisms influences the host's immune responses (both inside the gut and at distant sites). Indeed, many microbial-derived antigens, secreted compounds, surface molecules and cell-wall components (*e.g.* peptidoglycan, exopolysaccharides, teichoic acids, and mannans) have immunomodulatory properties (Lebeer *et al.*, 2010). While it appears obvious that the type of immune-related response depends on intrinsic characteristics of each type of microbe (*e.g.* Gram-positive or Gram-negative bacteria, yeasts or fungi) and species, immune tuning also appears to be strain-specific - as has been demonstrated *in vitro* for probiotic LAB (Foligné *et al.*, 2007, Nova *et al.*, 2007), bifidobacteria (Hoarau *et al.*, 2008, Riedel *et al.*, 2006) and yeasts (Foligné *et al.*, 2010, Maccaferri *et al.*, 2012, Romanin *et al.*, 2010). In contrast, only sporadic attempts have been made to characterize the immune patterns induced by a

very small number of bacterial or eukaryotic food strains isolated from cheese-ripening ecosystems (Rhaman *et al.*, 2013).

As the interest in whether food microorganisms are able to withstand digestive stress grows, many batch-based models of *in vitro* digestion have been developed (for a review, see Hur *et al.* (2010)). Several “dynamic” models (intended to reproduce the time course of digestion) have also been designed (for reviews, see Guerra *et al.* 2012),. Whereas *in vivo* studies in animal models are quite expensive and intricate to perform, *in vitro* models offer greater reproducibility, few ethical issues and the ability to collect samples throughout the experiment. Most of the *in vitro* approaches have focused on aspects of food digestion, such as the bioavailability of nutrients (Salvia-Trujillo *et al.*, 2013) and the release of food-borne toxins (Versantvoort *et al.*, 2005). The lack of literature data on the fate of food microorganisms in general and ripened-cheese microbiota in particular prompted us to design a series of experiments on the strains' ability to survive simulated gastric and duodenal digestion.

We therefore isolated microorganisms from surface-ripened cheese (Mounier *et al.*, 2008) and set up a two-step screening method consisting of (i) a batch-based *in vitro* gastric and/or duodenal challenge and ii) assays for cytokines released *in vitro* by human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Lastly, some strains were included in a rennet gel, in order to assess the potential protective effect of a dairy food matrix.

2. Material and Methods

2.1 Microorganisms

The list of microorganisms used in the present study is available on Table 1. With the exception of *Hafnia alvei* GB01, all of the 36 microorganisms considered in our study (21 bacteria, 12 yeasts and three fungi), were isolated from dairy environments. Most were found on surface-ripened cheeses. Three commercially available probiotic strains– *i.e.* *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC53103 (Valio, Helsinki), *Saccharomyces boulardii* (Biocodex, Gentilly, France) and *E.coli* Nissle 1917 (Ardeypharm, Herdecke, Germany) were used for comparative purposes. Furthermore, five bacterial strains (*Bifidobacterium longum* Bb536, *Escherichia coli* TG1, *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Lactobacillus salivarius* Ls33 and *Lc. Lactis* MG1363) were used as references in the PBMC stimulation assay, as previously described (Foligne *et al.*, 2007).

Table 1. List of the microbial strains and growth conditions used in the present study

Species	Strain	Origin	Media	Growth conditions, °C ; rpm
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	CNCM I-2809	Yogurt	MRS	37 °C - static
<i>Lactococcus lactis</i>	S3	Cheese	M17	30°C - static
<i>Streptococcus thermophilus</i>	CNCM I-2802	Yogurt	M17	42°C - static
<i>Streptococcus thermophilus</i>	LMD-9	Yogurt	M17	42°C - static
<i>Streptococcus thermophilus</i>	LMG-18311	Yogurt	M17	42°C - static
<i>Arthrobacter arilaitensis</i>	Re 117 ^T	Cheese(Reblochon)	BHI	25°C – 200 rpm
<i>Arthrobacter arilaitensis</i>	3M03	Cheese (Livarot)	BHI	25°C – 200 rpm
<i>Arthrobacter arilaitensis</i>	Ma107	Cheese (Maroilles)	BHI	25°C – 200 rpm
<i>Brevibacterium aurantiacum</i>	ATCC 9174	Cheese (Romadur)	BHI	25°C – 250 rpm
<i>Brevibacterium aurantiacum</i>	ATCC 9175	Cheese(Camembert)	BHI	25°C – 250 rpm
<i>Brevibacterium aurantiacum</i>	Ba 171	Cheese (Munster)	BHI	25°C – 250 rpm
<i>Corynebacterium casei</i>	2M01	Cheese (Livarot)	BHI	25°C – 200 rpm
<i>Corynebacterium casei</i>	DPC S298 ^T	Cheese (Gubbeen)	BHI	25°C – 200 rpm
<i>Corynebacterium casei</i>	1-3b	Cheese (Livarot)	BHI	25°C – 200 rpm
<i>Escherichia coli</i>	1E14	Cheese (Livarot)	BHI	25°C – 200 rpm
<i>Hafnia alvei</i>	GB01	Cheese	BHI	25°C – 200 rpm
<i>Hafnia alvei</i>	Type 2 n°920	Dairy products	BHI	25°C – 200 rpm
<i>Hafnia alvei</i>	B16	Cheese (Livarot)	BHI	25°C – 200 rpm
<i>Staphylococcus equorum</i>	Mu2	Cheese (Munster)	BHI	25°C – 200 rpm
<i>Staphylococcus equorum</i>	1265/GM16	Cheese (Camembert)	BHI	25°C – 200 rpm
<i>Staphylococcus equorum</i>	Mu206	Cheese (Munster)	BHI	25°C – 200 rpm
<i>Debaryomyces hansenii</i>	1L25	Cheese (Livarot)	PDB	25°C – 200 rpm
<i>Debaryomyces hansenii</i>	CLIB 623	Cheese	PDB	25°C – 200 rpm
<i>Debaryomyces hansenii</i>	CBS 767	Cheese	PDB	25°C – 200 rpm
<i>Geotrichum candidum</i>	ATCC 204307	Cheese (Pont l'évêque)	PDB	25°C – 200 rpm
<i>Geotrichum candidum</i>	UCMA 359	Cheese	PDB	25°C – 200 rpm
<i>Geotrichum candidum</i>	UCMA 103	Cheese	PDB	25°C – 200 rpm
<i>Kluyveromyces lactis</i>	CLIB 196	Cheese	PDB	25°C – 200 rpm
<i>Kluyveromyces lactis</i>	CLIB 531	Cheese	PDB	25°C – 200 rpm
<i>Kluyveromyces lactis</i>	CLIB 683	Cheese	PDB	25°C – 200 rpm
<i>Yarrowia lipolytica</i>	1E07	Cheese (Livarot)	PDB	25°C – 200 rpm
<i>Yarrowia lipolytica</i>	CLIB 632	Cheese	PDB	25°C – 200 rpm
<i>Yarrowia lipolytica</i>	CLIB 791	Cheese	PDB	25°C – 200 rpm
<i>Penicillium camemberti</i>	FM 13	Cheese	PDB	25°C – 200 rpm
<i>Penicillium camemberti</i>	FM 340	Cheese	PDB	25°C – 200 rpm
<i>Penicillium camemberti</i>	PcR	Commercial strain	PDB	25°C – 200 rpm
<i>Saccharomyces boulardii</i>	Ultralevure	Commercial strain	PDB	25°C – 200 rpm
<i>Escherichia coli</i>	Nissle 1917	Commercial strain	BHI	25°C – 200 rpm
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	LGG -ATCC53103	Commercial strain	MRS	37 °C – static

2.2 Growth and plate count media

All growth media were purchased from Biokar Diagnosis (Beauvais, France), with the exception of potato dextrose broth (PDB: Difco, Pessac, France). Prior to use in the experiments described below, all strains were grown until they reached the same growth phase (the late stationary phase, as defined in prior growth kinetics experiments; data not shown). With the exception of LAB, all bacteria were cultured in 100 mL of brain heart infusion (BHI) broth in 500 mL Erlenmeyer flasks at 25°C, with shaking at 200 rpm. The LAB *Lactococcus (Lc.) lactis subsp. lactis* was cultured in M17 medium in 100 mL Schott bottles at 30°C. *Streptococcus thermophilus* was cultured in M17 medium supplemented up to 20 g/L of lactose in 100 mL Schott bottles at 42°C. Lactobacilli were grown in DeMan, Rogosa and Sharpe broth (MRS) in 100 mL bottles at 37°C. Yeasts were grown in 100 mL of PDB in 500 mL Erlenmeyer flasks at 25°C, with shaking at 200 rpm. Microorganisms were counted on the agar-based media used for liquid cultures, *i.e.* BHI agar for strains grown in BHI broth, for example. Eukaryotes were plated on yeast extract glucose chloramphenicol plates. The incubation temperatures were the same as in broth cultures. Prior to plating, cultures were diluted in Maximum Recovery Diluent (MRD, 9 g/L) (Difco).

With respect to the reference strains for immune cell stimulation, lactobacilli were grown with limited aeration at 37°C in MRS broth, the *Bifidobacterium* strain was grown anaerobically in MRS supplemented with 0.05% L-cysteine-hydrochloride (Sigma), *L. lactis* MG1363 was grown at 30°C in M17 broth supplemented with 0.5% glucose, and *E.coli* was grown at 37°C in lysogeny broth (Difco).

Counting was performed on the corresponding agar-based media used for liquid culture, *i.e.* BHI agar for strains grown in BHI broth, for example. Anaerobic strains were grown in jars using Genbox anaer medium (Biomérieux, Marcy-l'Etoile, France). The same incubation temperatures were used as for broth cultures. Colony-forming units were counted using ComptatPétri software (Guillemin *et al.* 2014).

2.3 The cytokine release assay

Peripheral blood mononuclear cells were isolated from four healthy donors, as previously described (Foligné *et al.*, 2007). Related to the above-mentioned study, interleukin 10 (IL-10), interleukin 12 (IL-12), interferon gamma (IFN γ) and tumor necrosis factor alpha (TNF α) were chosen as biomarker of the *in vitro* immunomodulatory response. Briefly, after Ficoll gradient centrifugation (Pharmacia, Uppsala, Sweden), PBMCs were collected, washed in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (Life Technologies, Paisley, Scotland) and adjusted to 2×10^6 cells/mL in RPMI 1640 supplemented with gentamicin (150 μ g/mL), L-glutamine (2 mM), and 10% fetal calf serum (Gibco-BRL). The PBMCs (2×10^6 cells/mL) were seeded in 24-well tissue culture plates (Corning Inc, Corning, NY, USA). Next, ten microliters of thawed microbial suspensions of each of the reference strains and the microorganisms to be tested were added. Stationary-phase microbes were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) and resuspended in PBS containing 20% glycerol. A portable photometer (Densimat, BioMérieux, Craponne, France) was used to adjust the cell density to McFarland 3 (Araujo *et al.*, 2004). The microbial preparations were thus standardized in terms of cell biomass (corresponding to approximately 2×10^8 CFU/mL, for *E. coli*) and stored at -80°C until subsequent use within three months. Survival rates of over 90% were observed for all frozen samples (data not shown). This resulted in a bacterium-to-PBMC ratio of approximately 10:1 for *E. coli*. Phosphate-buffered saline containing 20% glycerol was used as a negative (non-stimulated) control. On the basis of preliminary time-course experiments, 24 h of stimulation was determined to be the optimal time point for cytokine responses of bacterium-stimulated PBMCs. After 24 h of stimulation at 37°C in an atmosphere of air with 5% CO_2 , culture supernatants were collected, centrifuged and stored at -20°C prior to cytokine analysis. Neither acidification of the medium nor bacterial proliferation was observed. Cytokine levels were measured with ELISAs (from BD Biosciences (San Jose, CA, USA) for IL-10, IFN γ and IL-12p70, and from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) for TNF α), according to the manufacturers' instructions. The results were first expressed as pg/L for each donor and then as a mean value across all donors, as a percentage of the value for a reference strain (*e.g.* *B. longum* Bb536 for IL-10 and *Lc. Lactis* MG1363 for IL-12, TNF α and IFN γ). This means of normalization (*i.e.* using strains as internal standards) has been shown to be accurate and reproducible for experiments with small number of donors and large numbers of strains (Foligné *et al.*, 2007).

2.4 In vitro gastric and duodenal batch challenges

The stress conditions and the stress medium's composition were adapted from the work of Lo Curto et al. (2011). All digestive juice components were purchased from Sigma (Saint-Quentin-Fallavier, France) and diluted in MRD. Pepsin (P6887, EC 3.4.23.1, activity: 3300 U/mg of protein, calculated using hemoglobin as a substrate), pancreatin (P1750), and bile (B8631) were of porcine origin. The “gastric lipase” was a recombinant enzyme produced in the fungus *Rhizopus oryzae* (80612, EC 3.1.1.3, activity: ≥ 30 U/mg). Simulated gastric and duodenal juices were made fresh daily. Gastric juice consisted in pepsin (0.025 g/L or 1.10^6 U/mL), lipase from *R. oryzae* (0.2 g/L or 6.10^4 U/L) and NaCl (2.75 g/L) suspended in a 0.020 M glycine-HCl buffer pH 3 at 37°C prior to experiments.

Duodenal juice was prepared by suspending pancreatin (9 g/L, bile (30 g/L) and NaCl (7 g/L) in 0.1 M phosphate buffer pH 6.5 at 37°C, prior to the experiments. One milliliter of a late-stationary phase culture was added to 9 mL of either gastric or duodenal juice in a 45 mL sterile screw-cap tube. The pH was checked again after inoculation and (if necessary) re-adjusted to either pH 3 or pH 6.5. The incubation times were respectively 1 h and 2 h for gastric and duodenal juices at 37°C, with moderate shaking (100 rpm). The serial stress condition (*i.e.* gastric stress followed by duodenal stress) was performed by adjusting the pH of a one-hour gastric juice incubation to 6.5 with 1M Na_2CO_3 , and then adding bile and pancreatin under sterile conditions for the subsequent 2 h duodenal incubation. To assess cell survival, strains were counted on the corresponding agar-based media before and after each stress condition.

2.5 Rennet gel inclusion and the combined batch challenge

Rennet gel inclusion was carried out in two steps. Firstly, 0.2 mL of a 10 g/L CaCl_2 solution was added to 225 mL of standard, pasteurized, semi-skimmed milk (Lactel, Laval, France) and preheated for 30 min at 32°C. Secondly, 25 mL of a mixture of all the microorganisms and 0.1 mL of rennet (Naturen 450, containing 555 mg/L of active chymosin, 145 international milk-clotting units/mL; Chr. Hansen, Arpajon, France) were added to the matrix, which was gently stirred for a few seconds before being left to gel unstirred at 32°C for 40 min.

Formation of the rennet gel was monitored by measuring the shear storage modulus (G'), the shear loss modulus (G'') and the damping factor ($\tan \delta$, defined as the ratio of the shear loss to the storage modulus, G''/G' , adapted from Morand et al. (2011)). We used a stress-controlled rheometer (MCR 301 (Anton Paar, Courtaboeuf, France), equipped with a coaxial cylinder geometry (CC27, inner cylinder: 27 mm)) in oscillatory mode (1 Hz) and with a strain of 1%. Before the experiment, we checked that the chosen association angular frequency/oscillatory shear value was located within the linear part of the gel response.

We considered the gelation process was complete when G' and G'' reached a plateau. It was obtained for a 40-minute gelation period for G' and G'' values of respectively (2.15 ± 0.39) Pa and (0.60 ± 0.09) Pa ($n=3$). One gram of rennet gel matrix with entrapped microorganisms was used in each new series of experiments, as described in the previous section.

2.6 Statistical analysis

Results are expressed as the mean $\pm$ standard deviation of three biologically independent experiments and were compared using a two-tailed Student's t-test. The statistical significance of a given test result is indicated as follows: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

3. Results

3.1 Immunomodulatory profiles of the selected microorganisms

We measured the ability of 35 cheese-ripening microorganisms to induce cytokine responses by PBMCs *in vitro*. Up to three strains per species were tested. As expected from previous research on the biodiversity of environmental and food-isolated microbes, we observed substantial inter-group variations in anti-inflammatory IL-10 production. Although lactobacilli, streptococci and *E. coli* were quite weak IL-10 inducers, some members of the *Arthrobacter* and *Staphylococcus* genera were strong IL-10 inducers (Fig. 1). It is noteworthy that a strain of *B. aurantiacum* (Ba 171) and the three *Staphylococci* induced significantly higher levels of IL-10 than the well-known probiotic strain *B. longum* Bb536 ($p < 0.05$). The latter *B. longum* reference strain had much the same *in vitro* anti-inflammatory potential as *A. arilaitensis* RE 117^T and 3M01. For several species (including *C. casei*, *B. aurantiacum* and *H. alvei*), the cytokine release appeared to be strain-dependent, with low inducers and high inducers from the same species. In terms of eukaryotic strains, the three *P. camembertii* and *G. candidum* strains were all unable to induce substantial immune responses but other species of yeast induced moderate levels of cytokine production (and IL-10 production in particular). This contrasted with the results described above for bacteria, where cytokine production was substantially higher and often differed from one strain to another for a given species.

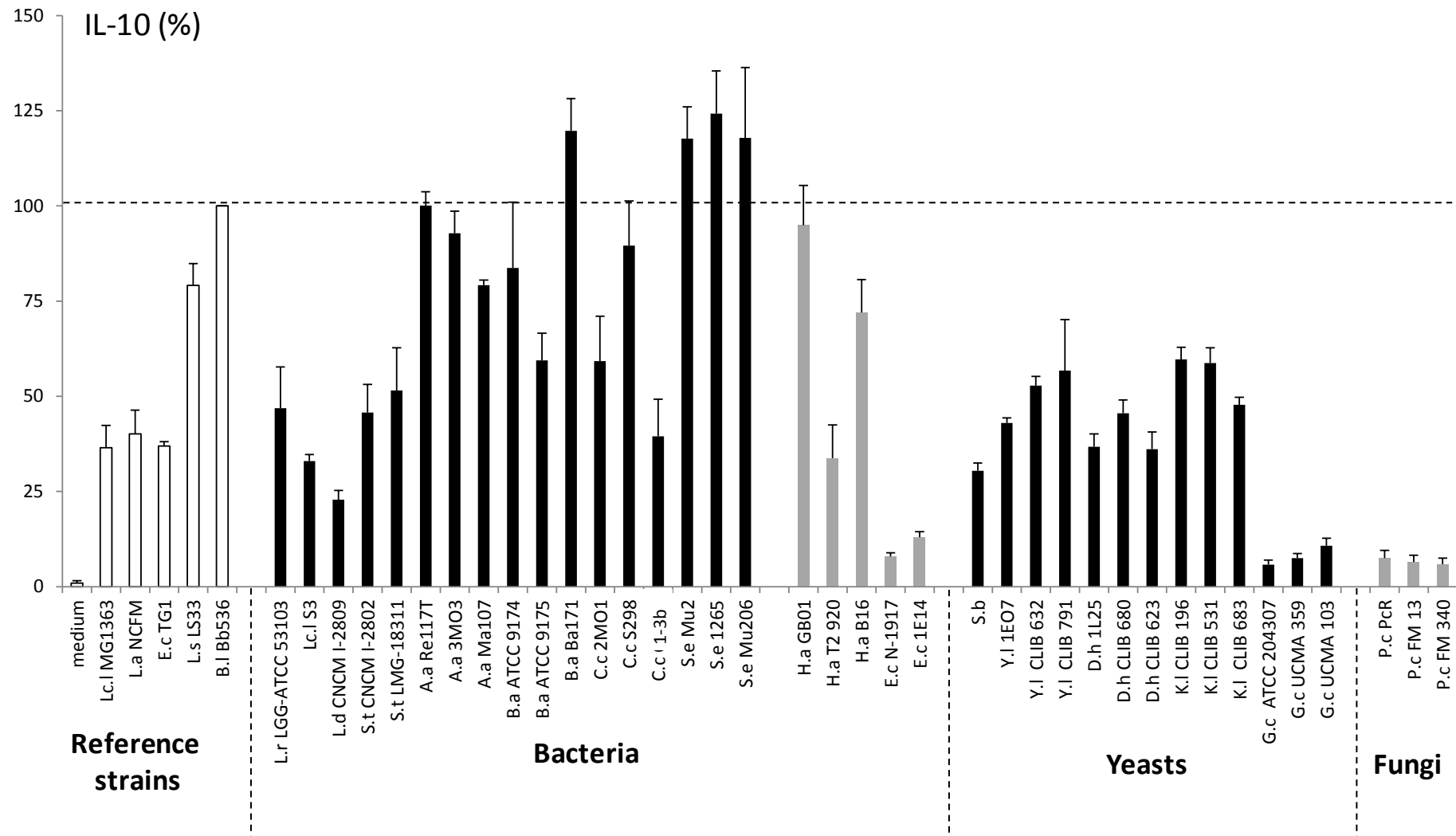


Figure 1. Production of IL-10 in supernatants of cultured human PBMCs (from 4 donors) stimulated (for 24h) with an equivalent biomass of various live strains of dairy bacteria, yeasts, fungi or lab-cultured probiotics. Data (mean $\pm$ SEM) are expressed as a percentage of a strongly IL-10-inducing reference strain.

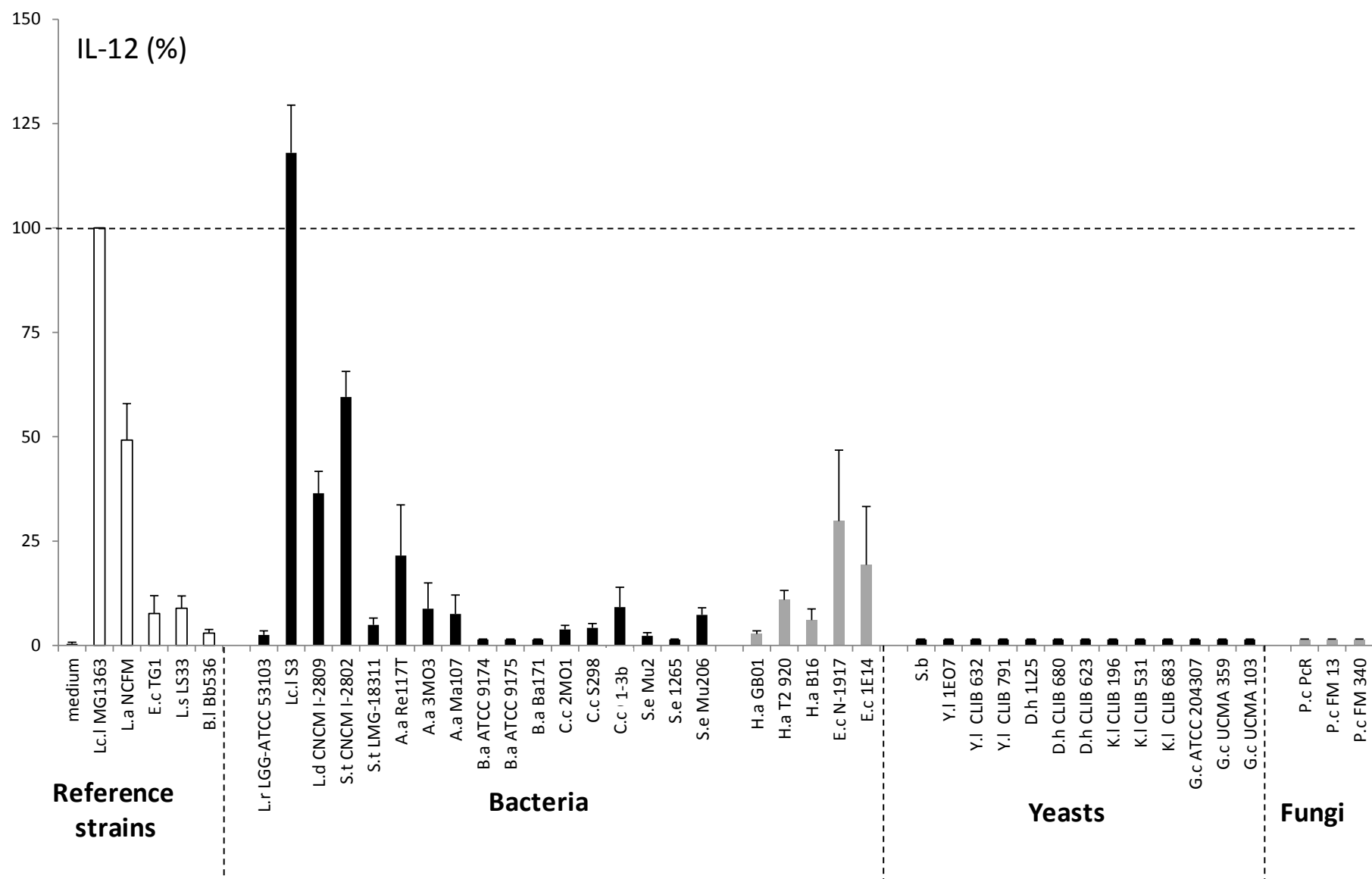


Figure 2. Production of IL-12 in supernatants of cultured human PBMCs (from 4 donors) stimulated (for 24h) with an equivalent biomass of various live strains of dairy bacteria, yeasts, fungi or lab-cultured probiotics. Data (mean $\pm$ SEM) are expressed as a percentage of a strongly IL-12-inducing reference strain.

When considering the induction of pro-inflammatory cytokines, most of the cheese-ripening bacteria induced low level release of pro-inflammatory mediators (with the exception of *Lc. lactis* S3, *Lb. delbrueckii ssp bulgaricus* CNCM I-2809 and *S. thermophilus* CNCM I-2802 for IL-12 release and *Staphylococcus equorum* Mu206 for IFN γ release). No pro-inflammatory cytokine release could be detected for any of the fungi and yeasts (Fig. 2 and 3). Accordingly, the levels of TNF α released by the PBMCs (which are less discriminant at the genus and strain levels) were fairly similar for Gram-negative and Gram-positive bacteria. The levels of TNF α released after incubation of PBMCs with eukaryotes were about half those measured after incubation with bacteria (Fig. 4). Overall, cheese-ripening bacteria and (to a lesser extent) yeasts and fungi show inter-species and inter-strain differences in their ability to drive immune cell responses *in vitro*. Although these individual microbial responses were mainly related to IL-10 release, some variations in the anti-inflammatory balance were due to the specific release of pro-inflammatory mediators.

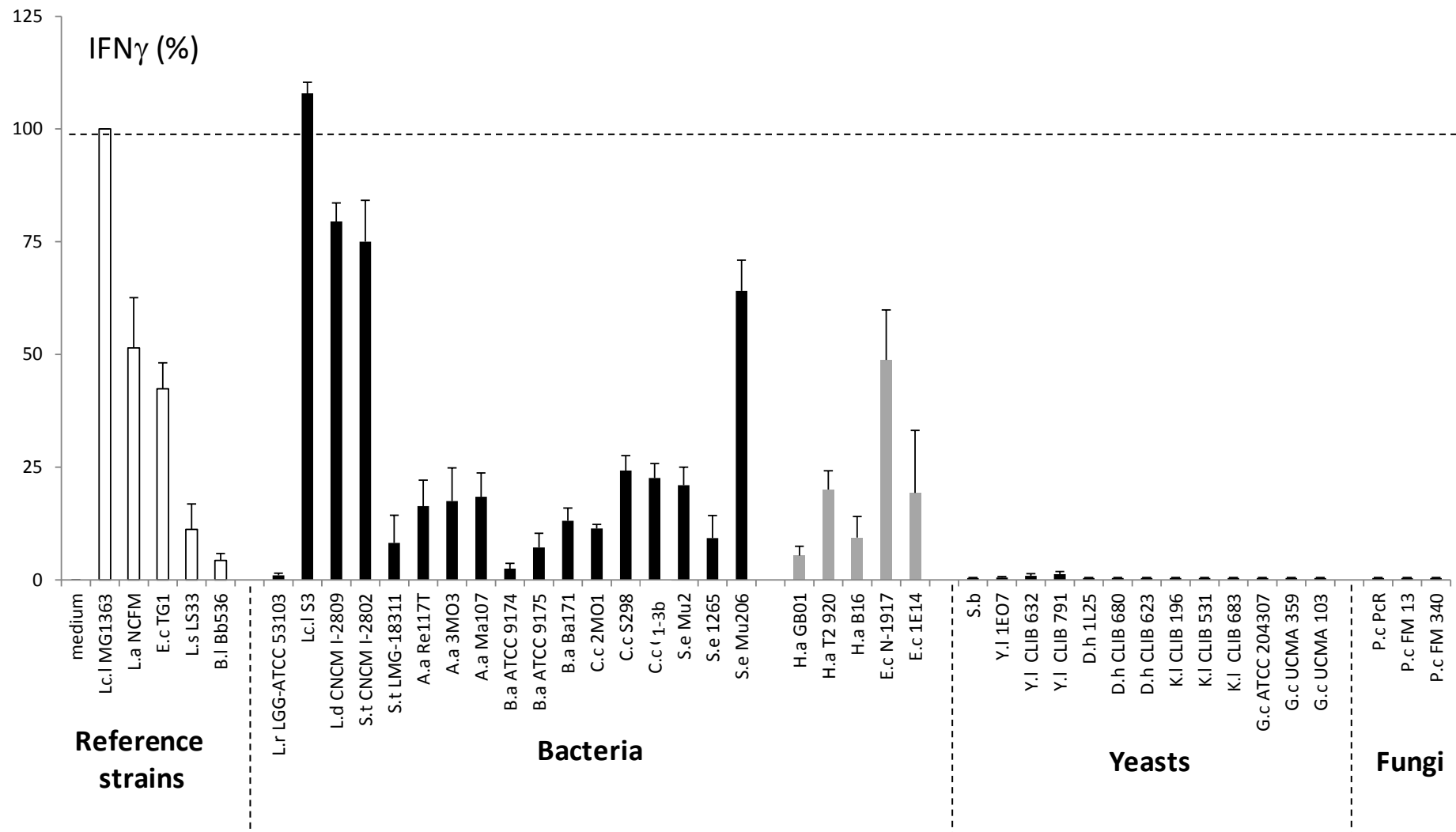


Figure 3. Production of IFN γ in supernatants of cultured human PBMCs (from 4 donors) stimulated (for 24h) with an equivalent biomass of various live strains of dairy bacteria, yeasts, fungi or lab-cultured probiotics. Data (mean $\pm$ SEM) are expressed as a percentage of the value observed for the strongest IFN γ -inducing reference strain (a *Lc. lactis*).

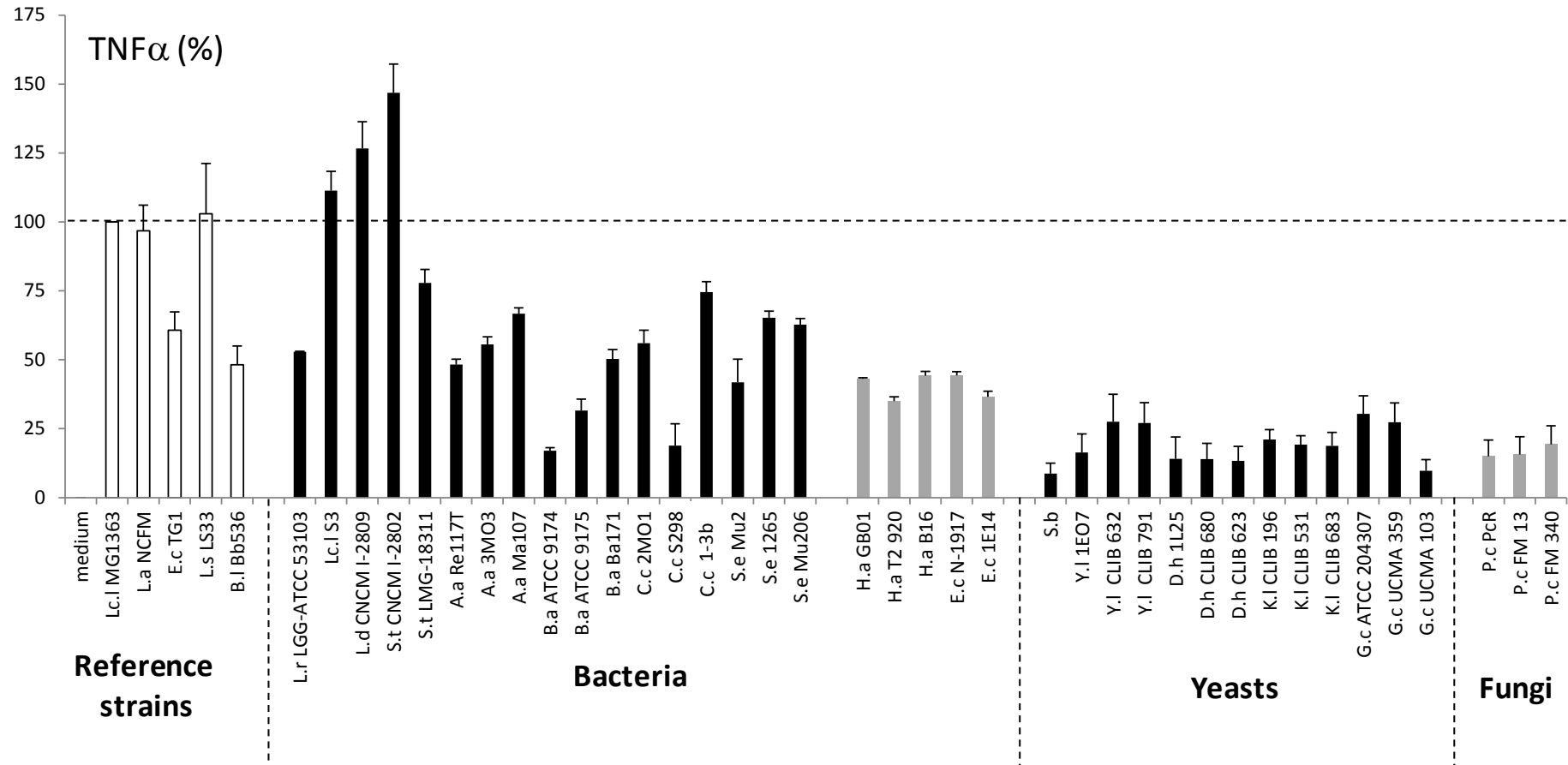


Figure 4. Production of TNF α in supernatants of cultured human PBMCs (from 4 donors) stimulated (for 24h) with an equivalent biomass of various live strains of dairy bacteria, yeasts, fungi or lab-cultured probiotics. Data (mean $\pm$ SEM) are expressed as a percentage of the value observed for the strongest TNF α -inducing reference strain (a *Lc. lactis*).

3.2 Survival of cheese-ripening microorganisms following *in vitro* gastric and duodenal batch challenges

We assessed the resistance of a number of surface-ripened cheese isolated microorganisms to incubation under gastric-like stress conditions (for 1 h with pepsin, at 37°C and pH 3) and duodenal-like stress conditions (for 2 h with bile and pancreatic enzymes, at 37°C and pH 6.5). Incubation under gastric-like conditions and then under duodenal-like conditions was also performed. The reference strains *S. boulardii* Biocodex and *E.coli* Nissle (Table 2) did not display any decrease in viability when submitted any of the stress conditions. *Lb. rhamnosus* GG survived a gastric challenge but did not withstand a duodenal challenge.

Neither *Y. lipolytica* nor *G. candidum* showed a significant decrease in viability when exposed to gastric and/or duodenal challenges ($p < 0.05$) (Table 2). For a given species, there were no inter-strain differences in sensitivity to gastric or duodenal challenges. *Debaryomyces hansenii* strain CLIB 623 and 1L25 displayed a statistically significant drop in viability ($p < 0.05$) after exposure to gastric-like stress and combined gastric- and duodenal-like stress, respectively. However, the difference in count between the reference and challenge conditions was only 0.25 log CFU/mL (for strain CLIB623) and 0.26 log CFU/mL (for strain 1L25). These values are below the generally accepted accuracy limit for plate counting (0.5 log CFU/mL). *Kluyveromyces lactis* showed a slightly higher sensitivity, with statistically significant differences ($p < 0.01$ or $p < 0.001$) between control and stress groups for all strains and all challenge conditions. The strain CLIB 196 displayed a loss of viability of 0.81 log CFU/mL, 0.86 log CFU/mL and 0.74 log CFU/mL under gastric, duodenal and combined challenge conditions, respectively. CLIB 531 showed similar behavior. The *K. lactis* strain CLIB 683 was the most sensitive to *in vitro* digestion, with a loss of viability of 1.66 log CFU/mL, 1.05 log CFU/mL and almost 2 log CFU/mL under gastric, duodenal and combined challenge conditions, respectively.

Table 2. Survival of reference microorganisms and selected surface-ripened cheese yeasts and fungi in gastric, duodenal and combined *in vitro* challenges

Reference strain	Gastric challenge			Duodenal challenge			Combined challenge		
	Viable count (log CFU.mL ⁻¹)		Loss of viability (log CFU.mL ⁻¹)	Viable count (log CFU.mL ⁻¹)		Loss of viability (log CFU.mL ⁻¹)	Viable count (log CFU.mL ⁻¹)		Loss of viability (log CFU.mL ⁻¹)
	No digestion	1h challenge		No digestion	2h challenge		No digestion	3h challenge	
<i>L. rhamnosus</i>									
LGG - ATCC53103	7.18 ± 0.05	6.87 ± 0.12 *	− 0.31	7.04 ± 0.28	0	T	6.92 ± 0.19	0	T
<i>S. boulardii</i>									
Ultralevure	6.99 ± 0.12	7.09 ± 0.19	+ 0.10	6.86 ± 0.17	6.98 ± 0.11	+ 0.12	6.84 ± 0.14	7.12 ± 0.05 *	+ 0.28
<i>E. coli</i>									
Nissle 1917	9.31 ± 0.13	9.52 ± 0.05 *	+ 0.21	9.47 ± 0.11	9.35 ± 0.09 *	− 0.12	9.21 ± 0.16	9.15 ± 0.08	− 0.06
Yeasts and fungi									
<i>D. hansenii</i>									
1L25	6.89 ± 0.21	6.92 ± 0.25	+ 0.03	6.85 ± 0.11	6.70 ± 0.16	+ 0.05	6.54 ± 0.11	6.80 ± 0.01 *	+ 0.26
CLIB 623	6.87 ± 0.07	7.11 ± 0.01 *	+ 0.25	7.06 ± 0.13	7.17 ± 0.22	+ 0.11	7.17 ± 0.06	7.15 ± 0.15	+ 0.08
CBS 767	6.86 ± 0.15	6.83 ± 0.15	− 0.03	7.01 ± 0.07	7.09 ± 0.17	+ 0.08	6.98 ± 0.05	7.05 ± 0.08	+ 0.07
<i>G. candidum</i>									
ATCC 204307	3.69 ± 0.26	3.73 ± 0.25	+ 0.04	3.68 ± 0.19	3.76 ± 0.23	+ 0.08	3.69 ± 0.25	3.56 ± 0.26	− 0.13
UCMA 359	3.76 ± 0.14	3.72 ± 0.13	− 0.04	3.75 ± 0.24	3.68 ± 0.15	− 0.07	3.73 ± 0.16	3.57 ± 0.17	− 0.16
UCMA 103	3.68 ± 0.23	3.70 ± 0.15	+ 0.02	3.67 ± 0.27	3.62 ± 0.22	− 0.05	3.68 ± 0.33	3.70 ± 0.22	+ 0.02
<i>K. lactis</i>									
CLIB196	8.27 ± 0.09	7.46 ± 0.07 ***	− 0.81	8.46 ± 0.20	7.60 ± 0.17 **	− 0.86	8.27 ± 0.11	7.53 ± 0.15 ***	− 0.74
CLIB 531	8.09 ± 0.01	7.21 ± 0.06 ***	− 0.88	8.14 ± 0.06	7.24 ± 0.14 ***	− 0.90	7.96 ± 0.09	7.40 ± 0.06 **	− 0.56
CLIB 683	8.53 ± 0.18	6.87 ± 0.20 ***	− 1.66	8.42 ± 0.25	7.37 ± 0.11 **	− 1.05	8.34 ± 0.12	6.37 ± 0.13 ***	− 1.97
<i>P. camemberti</i>									
PcR	4.93 ± 0.21	5.06 ± 0.16	+ 0.13	5.03 ± 0.26	3.71 ± 0.16 ***	− 1.32	4.93 ± 0.21	3.45 ± 0.07 ***	− 1.48
FM 13	3.98 ± 0.32	4.20 ± 0.22	+ 0.22	3.71 ± 0.19	2.55 ± 0.22 ***	− 1.16	3.98 ± 0.32	2.78 ± 0.11 ***	− 1.20
FM 340	4.57 ± 0.31	4.22 ± 0.12	− 0.35	4.22 ± 0.23	3.15 ± 0.19 ***	− 1.07	4.57 ± 0.26	3.21 ± 0.21 ***	− 1.36
<i>Y. lipolytica</i>									
1E07	7.20 ± 0.05	7.09 ± 0.03	− 0.11	7.13 ± 0.15	7.14 ± 0.11	+ 0.01	7.22 ± 0.16	7.20 ± 0.13	− 0.02
CLIB 632	6.90 ± 0.09	6.79 ± 0.02	− 0.11	6.91 ± 0.07	6.84 ± 0.05	− 0.07	6.86 ± 0.15	6.84 ± 0.12	+ 0.02
CLIB 791	6.69 ± 0.11	6.73 ± 0.11	+ 0.04	6.87 ± 0.16	6.89 ± 0.11	+ 0.02	6.85 ± 0.28	6.82 ± 0.35	− 0.03

With reference to the LAB, *Lc. lactis subsp. lactis* showed a loss of viability of 1 log CFU/mL following exposure to gastric stress and did not survive the duodenal challenge or a combined gastric-duodenal challenge. Along with *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *S. thermophilus* did not survive any of the challenge conditions (Table 3). The various cheese-ripening bacteria (Table 3) showed three different responses to *in vitro* digestion. One subgroup (including *H. alvei*, *E. coli* and the Mu206 and 1265 strains of *S. equorum*) was strongly resistant to all three stress conditions. Indeed, strain *H. alvei* 920 Type 2 did not display a significant loss of viability following exposure to any of the stress conditions. Strain B16 was only slightly sensitive to duodenal challenge and the combined challenge, with a loss of viability of 0.13 log CFU/mL and 0.19 log CFU/mL, respectively. Strain GB01 was slightly sensitive to the gastric challenge but not the combined challenge. A second subgroup of bacteria (comprising the three strains of *B. aurantiacum*, *S. equorum* Mu2 and *A. arilaitensis*) was rather resistant to duodenal conditions. Indeed, *S. equorum* Mu2 and *B. aurantiacum* ATCC 9175 respectively lost only 0.32 log CFU/mL and 0.06 log CFU/mL of viability after duodenal challenge. Strains of *A. arilaitensis* were more sensitive to duodenal conditions, with a loss of viability of almost 3 log CFU/mL. Within this subgroup, only *B. aurantiacum* ATCC 9174 survived the gastric conditions (with a count of 2.77 ± 0.22 log CFU/mL after the 1-hour challenge). However, the loss of viability was dramatic and *B. aurantiacum* ATCC 9174 (like all of the strains in the subgroup) did not survive the combined challenge. These results emphasized the value of testing a microorganism's resistance to duodenal stress as well as to gastric stress. The third subgroup comprised *C. casei*, which survived neither gastric nor duodenal stress. It is important to bear in mind that the present study is the first to have investigated the respective abilities of *S. equorum*, *B. aurantiacum*, *C. casei* and *A. arilaitensis* to withstand digestive stress.

Table 3. *In vitro* survival of selected surface-ripened cheese bacteria in gastric, duodenal and combined *in vitro* challenges

Bacteria	Gastric challenge			Duodenal challenge			Combined challenge		
	Viable count (log CFU.mL ⁻¹)		Loss of viability (log CFU.mL ⁻¹)	Viable count (log CFU.mL ⁻¹)		Loss of viability (log CFU.mL ⁻¹)	Viable count (log CFU.mL ⁻¹)		Loss of Viability (log CFU.mL ⁻¹)
	No digestion	1h		No digestion	2h		No digestion	3h	
<i>E. coli</i>									
1E14	9.11 ± 0.06	9.23 ± 0.15	+ 0.12	9.19 ± 0.01	9.13 ± 0.09	− 0.06	9.32 ± 0.06	9.10 ± 0.08 *	− 0.22
<i>H. alvei</i>									
GB01	9.32 ± 0.07	8.91 ± 0.20 *	− 0.41	9.17 ± 0.04	8.93 ± 0.07	− 0.24	9.14 ± 0.08	8.89 ± 0.06	− 0.25
Type 2 n°920	8.73 ± 0.04	8.68 ± 0.11	− 0.05	8.66 ± 0.12	8.71 ± 0.05	+ 0.05	8.68 ± 0.11	8.66 ± 0.21	− 0.02
B16	8.55 ± 0.05	8.61 ± 0.07	+ 0.06	8.54 ± 0.04	8.41 ± 0.05 *	− 0.13	8.37 ± 0.22	8.56 ± 0.11 *	+ 0.19
<i>S. equorum</i>									
Mu2	8.54 ± 0.01	0	T	8.60 ± 0.01	8.28 ± 0.04 ***	− 0.32	8.62 ± 0.04	0	T
1265/GM16	8.31 ± 0.07	8.40 ± 0.15	+ 0.09	8.65 ± 0.15	8.53 ± 0.05	− 0.12	8.65 ± 0.12	8.79 ± 0.05	+ 0.14
Mu206	8.71 ± 0.20	8.88 ± 0.08 *	+ 0.17	8.21 ± 0.02	7.34 ± 0.06 ***	− 0.87	8.64 ± 0.15	7.98 ± 0.09 **	− 0.75
<i>B. aurantiacum</i>									
ATCC 9174	7.28 ± 0.23	2.77 ± 0.22 ***	− 4.51	7.59 ± 0.05	6.25 ± 0.03 ***	− 1.34	7.61 ± 0.14	0	T
ATCC 9175	8.73 ± 0.21	0	T	8.74 ± 0.14	8.68 ± 0.06	− 0.06	8.74 ± 0.13	0	T
Ba 171	8.46 ± 0.17	0	T	8.66 ± 0.02	7.48 ± 0.50 **	− 1.18	8.81 ± 0.12	0	T
<i>A. arilaitensis</i>									
Re 117 ^T	8.42 ± 0.13	0	T	8.46 ± 0.14	4.50 ± 0.21 ***	− 2.96	8.45 ± 0.14	0	T
3M03	8.48 ± 0.18	0	T	8.60 ± 0.14	4.00 ± 0.16 ***	− 3.60	8.58 ± 0.05	0	T
Ma107	8.53 ± 0.10	0	T	8.61 ± 0.12	4.09 ± 0.13 ***	− 3.52	8.60 ± 0.12	0	T
<i>C. casei</i>									
2M01	8.54 ± 0.16	0	T	8.73 ± 0.23	2.08 ± 0.11 ***	− 5.65	8.72 ± 0.12	0	T
DPC S298 ^T	8.50 ± 0.13	0	T	8.63 ± 0.14	0	T	8.51 ± 0.13	0	T
1-3b	8.51 ± 0.11	0	T	8.55 ± 0.12	0	T	8.65 ± 0.15	0	T
<i>L. lactis</i>									
S3	8.37 ± 0.11	7.37 ± 0.12 ***	− 1	8.04 ± 0.31	0	T	7.99 ± 0.22	0	T
<i>S. thermophilus</i>									
CNCM I-2802	8.06 ± 0.16	0	T	8.01 ± 0.23	0	T	7.97 ± 0.23	0	T
LMD-9	8.04 ± 0.22	0	T	8.07 ± 0.15	0	T	8.02 ± 0.31	0	T
LMG-18311	8.12 ± 0.12	0	T	8.16 ± 0.19	0	T	7.89 ± 0.21	0	T
<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i>									
CNCM I-2809	7.96 ± 0.69	0	T	7.92 ± 0.33	0	T	7.89 ± 0.32	0	T

3.3 Ability of matrix-included microorganisms to survive a combined gastric- and duodenal-like challenge

Five bacteria (*S. equorum* Mu2, *B. aurantiacum* ATCC 9174, *A. arilaitensis* Re117^T, *C. casei* 2M01 and *Lc. lactis* S3) were selected for rennet gel inclusion experiments. Although all were sensitive to the combined challenge, the sensitivity profiles differed (Table 4). *Staphylococcus equorum* Mu2 was extremely sensitive to gastric challenge but not at all sensitive to duodenal challenge. Likewise, *B. aurantiacum* and *A. arilaitensis* were highly sensitive to gastric challenge but fairly resistant to duodenal challenge. *C. casei* did not withstand any of the challenges. When included in rennet gel, the viability of *B. aurantiacum* ATCC 9174 and *C. casei* 2M01 fell by 1.09 and 0.52 log CFU/mL, respectively (*i.e.* much less than the dramatic falls of 4.51 and 5.68 log CFU/mL seen with pure cultures). *Staphylococcus equorum* Mu2, and *A. arilaitensis* Re117^T (neither of which survived the gastric challenge in pure cultures) did not show any significant loss of viability (0.13 log CFU/mL and 0.08 log CFU/mL, respectively) when included in rennet gel. After the gastric challenge, the viability of *Lc. lactis* S3 fell by 1 log CFU/mL when tested as a pure culture and by 0.65 CFU/mL when tested as a rennet gel inclusion.

Hence, *S. equorum* Mu2, *B. aurantiacum* ATCC 9174 and *A. arilaitensis* survived a combined gastric and duodenal challenge when included in a rennet gel but not as pure cultures. In contrast, neither gel-included nor pure cultures of *Lc. lactis* S3 survived the combined challenge.

Table 4. *In vitro* survival of selected rennet-gel included microorganisms in gastric, duodenal and combined *in vitro* challenges

Rennet gel inclusion	Gastric challenge			Combined challenge		
	Viable count (log CFU.mL ⁻¹)		Loss of Viability (log CFU.mL ⁻¹)	Viable count (log CFU.mL ⁻¹)		Loss of Viability (log CFU.mL ⁻¹)
	No digestion	1h		No digestion	3h	
<i>A. arilaitensis</i> RE117 ^T						
Reference	8.42 ± 0.13	0	T	8.45 ± 0.14	0	T
Matrix inclusion	8.03 ± 0.03	7.92 ± 0.08	- 0.08	7.99 ± 0.03	4.91 ± 0.09 ***	- 3.08
<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9174						
Reference	7.28 ± 0.23	2.77 ± 0.22 ***	- 4.51	7.61 ± 0.14	0	T
Matrix inclusion	7.37 ± 0.15	6.28 ± 0.44 *	- 1.09	7.37 ± 0.15	5.79 ± 0.13 ***	- 1.58
<i>C. casei</i> 2M01						
Reference	8.54 ± 0.17	1.86 ± 0.19 ***	- 5.68	8.72 ± 0.12	0	T
Matrix inclusion	8.47 ± 0.19	7.95 ± 0.16 **	- 0.52	8.47 ± 0.19	0	T
<i>S. equorum</i> Mu2						
Reference	8.54 ± 0.01	0	T	8.53 ± 0.04	0	T
Matrix inclusion	8.53 ± 0.06	7.66 ± 0.26	+ 0.13	8.53 ± 0.04	8.26 ± 0.28	- 0.36
<i>L. rhamnosus</i> LGG						
Reference	8.18 ± 0.07	7.36 ± 0.03 ***	- 1.00	8.22 ± 0.13	0	T
Matrix inclusion	8.15 ± 0.12	7.32 ± 0.10 ***	- 0.83	8.02 ± 0.19	0	T
<i>L. lactis</i> S3						
Reference	8.37 ± 0.17	7.37 ± 0.11 **	- 1.00	7.99 ± 0.05	0	T
Matrix inclusion	8.23 ± 0.22	7.58 ± 0.15 *	- 0.65	8.32 ± 0.19	0	T

4. Discussion

Scientific interest in food digestion and nutrient bioavailability has grown markedly over the last decade. Indeed, several journals dedicated to this new field of science have been launched and the number of published articles has increased dramatically (from 400 in 1995 to nearly 1400 in 2013). In this context, the fate of food microbial ecosystems is of a great interest in terms of both their provision of nutrients and their potential effects on gut immunity.

One of the objectives of the present work was to obtain basic information about whether or not microorganisms (n=35) isolated from several surface-ripened cheeses and dairy environments were able to withstand simulated digestive stress. Given the broad variety of *in vitro* batch digestion models described in the literature, we first had to determine which parameters of the gastric and duodenal digestive media (composition, temperature, pH, etc.) were likely to have an impact on the microorganisms' viability. We then maintained these parameters throughout our experiments. However, *in vitro* batch methods cannot replace *in vivo* experiments, especially since the former do not take account of dynamic aspects of the digestive process. Nevertheless, our *in vitro* digestive model served as a quick, convenient means of screening a large number of microorganisms and will enabled us to select a smaller number of strains for further experimentation based on both sensitivity to *in vitro* digestive stress and *in vitro* immunomodulating properties.

The reference strains *E. coli* Nissle and *S. boulardii* were resistant to our *in vitro* experiments, in contrast to *L. rhamnosus* GG. Indeed, the latter microorganism is reportedly quite sensitive to digestive stress when not encapsulated or included in a dairy food matrix (Burgain *et al.*, 2013, de Vos *et al.*, 2009). On the basis of the literature data, we expected *E. coli* and *S. boulardii* to be resistant (Czerucka *et al.*, 2007, Krulwich *et al.*, 2011). Yeasts tend to be strongly resistant to digestive challenge; our results for these microorganism are in substantial agreement with previous reports (Lay *et al.*, 2004, Psomas *et al.*, 2001) in which a number of *D. hansenii*, *Y. lipolytica* and *G. candidum* strains survived well when exposed to similar stress. In Psomas *et al.*'s study (2001), the strain of *K. lactis* 531 displayed a drop in viability of about 2 log CFU/mLs following gastric stress, whereas the strain 570 was not sensitive to gastric stress at all. In our present experiments, the three selected *K. lactis* strains lost respectively 0.81, 0.88 and 1.66 log CFU/mL - reflecting the fairly good resistance highlighted in the literature. Kim *et al.* (1999) reported that *Lc. lactis* subsp. *lactis* strains were able to survive a pH as low as 2.5 (in M17 medium acidified with HCl). Consequently, our present results on *Lc. lactis* subsp. *lactis*' resistance to synthetic gastric juices are consistent with the species' physiology and the literature data. The other two LAB (*S. thermophilus* and *Lc. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) did not resistant any the stress conditions tested here. These findings are consistent with Lay *et al.*'s (2004) report that neither *S. thermophilus* nor *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* survived after

Camembert cheese was consumed by rats hosting human microbiota. *Escherichia coli* is a human commensal and thus was expected to survive to exposure to simulated gastric juices. Given that *H. alvei* is closely related to *E.coli* (Janda *et al.*, 2002) from genetic and phenotypic standpoints, its ability to withstand digestive stress is not surprising. However, our study is the first to have confirmed this profile.

As mentioned above, there is a dramatic lack of data on how Gram-positive microbiota from surface-ripened cheeses responds to digestive stress. However, studies of cheese ripening itself provide some clues. Indeed, *S. equorum* is part of the early smear-ripened cheese microbiota, when the cheese curd is still acidic (pH 5) (Bockelman *et al.*, 2002). In contrast, *C. casei* and *B. aurantiacum* only start to grow when pH 7 is reached during ripening, and so one can legitimately expect these two species to be quite acid-sensitive. By analogy, we expected some of the selected *S. equorum* strains to be able to survive the gastric challenge, and expected *C. casei* and *B. aurantiacum* to be quite acid-sensitive. We indeed found that two of the three *S. equorum* strains survived the simulated gastric challenge fairly well, whereas *C. casei* and *B. aurantiacum* did not survive exposure to the acidic environment. Unexpectedly, gastric stress neither sensitized to nor protected against subsequent duodenal stress under our experimental conditions. In other words, gastric and duodenal stress did not have a cumulative effect.

It is generally assumed that the presence of a food matrix will protect microorganisms against digestive stress. The matrix's buffering properties, structure and composition are often presented as the main factors that enhance the survival of microorganisms subjected to digestive stress (Salaun *et al.*, 2005, Sharp *et al.*, 2008). In the present study, the simulated gastric survival of Gram-positive bacteria was dramatically improved by inclusion in a rennet gel (when compared with non-included cultures). Conversely, only strains that were already resistant to duodenal challenge in pure culture were able to withstand a combined gastric and duodenal challenge when entrapped in a rennet gel. These results suggest that the cheese curd used during our experiments provided protection against a gastric challenge but not a duodenal challenge. Our results corroborates the work by Heidebach *et al.* (2009), in which encapsulation in rennet gel improved the ability of two *Lactobacillus paracasei* strains and a *Bifidobacterium lactis* strain to survive a similar type of *in vitro* gastric stress. However, it should be noted that microorganisms did not actually grow inside the rennet gel but were included prior to the *in vitro* digestive challenge. Development as part of an ecosystem (i.e. interaction with other microorganisms and with cheese matrix constituents) - is very likely to change a microorganism's physiological properties. It is possible that in addition to the putative structural, protective effect of the rennet gel, changes in growth conditions might influence a microorganism's survival of a digestive challenge. Nevertheless, we consider that these initial data

are worthy of interest and now intend to characterize the cheese matrix's influence on the ability of surface-ripened microbiota to survive digestive stress.

Our research on cytokine release from PBMCs provided new information regarding on the microorganisms' potential immunomodulatory (pro- or anti-inflammatory) properties – most of which had not been explored previously. Our present results highlight the broad diversity of immune-stimulating activities among cheese-ripening organisms. Although these microbial strains are frequently found in dairy products (either as part of the native microbiota in cheese factories or after deliberate introduction into the dairy matrices by manufacturers), their health potential has not been well characterized. This is partly due to the lack of in-depth data on the strains' respective abilities to survive in the gastrointestinal tract - a prerequisite for prospective probiotics. The few available studies were limited to survival and adhesion properties and focused on yeast strains (Binetti *et al.*, 2013; Kumura *et al.*, 2004) or lactobacilli spp (Pitino *et al.*, 2012; Solieri *et al.*, 2014). However, one of the objectives of the present study was to address the potential impact of extensively consumed live microorganisms, rather than to screen cheese microorganisms as new probiotics or to address the key role of cheese and dairy matrices as carriers for inoculated, well-characterized probiotics. Our results clearly show that bacteria and yeasts isolated from cheese (including *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Staphylococcus*, *Corynebacteria* and *Hafnia* spp, together with *Yarrowia*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces* and *Geotrichum*) are not inert from an immunological perspective. Whereas strains exhibiting a higher propensity to induce the anti-inflammatory cytokine IL-10 may contribute to immunomodulation and the alleviation of inflammatory events (such as arthritis and colitis), other strains with a pro-inflammatory profile (triggering the release of IL-12, IFN γ and TNF α) may have immunostimulatory functions, such as anti-infective or adjuvant. Due to the huge dietary intake of these species through cheese consumption, we cannot afford to neglect the likely impact on the immune balance and, more generally, the consumer's overall health status. Although common traits may occur within particular groups, each individual strain from a given genus and species displayed its own cytokine release ratio in *in vitro* PBMC assays. This ratio may be used as a guide to the strain's ability to trigger a specific response *in vivo*. However, a strain's survival aptitudes and immuno-enhancing/immunomodulatory properties may differ according to whether it is growing in isolation or (in contrast) interacting with other microorganisms in a cheese ecosystem. Thus, the study of the resulting net immune influence of ripened-cheese ecosystems is crucial for understanding the currently unsuspected effects of surface-ripened cheese microbiota on the host.

In conclusion, we found that *in vitro* simulated gastric stress was more deadly to the microorganisms tested here than duodenal stress was, (ii) there was no cumulative effect of sequential gastric and duodenal exposure, and (iii) inclusion in a cheese-like matrix (a rennet gel) protected sensitive microorganisms against the *in vitro* gastric challenge. Our present findings

confirm the importance of carrying out *in vitro* digestive challenges under conditions that are as close as possible to situation *in vivo*. Although experiments carried out in the absence of a matrix provide information on a strain's intrinsic ability to withstand digestive challenge, cheese-borne microorganisms are always ingested with their matrix. Use of a rennet gel inclusion was a first step. The next step will be to challenge microorganisms after growth in an actual ripened cheese. We should then be able to compare the respective abilities of “ecosystem-grown” and “pure-culture-grown” microorganisms to resist to digestive stress.

In view of (i) the co-existence of both neutral, immuno-enhancing and immunomodulatory ripening bacteria and yeast and (ii) difference in survival, one could conceivably select different strains and create mixtures of microorganisms with distinct properties. The same method (*i.e.* assessment of the response to *in vitro* digestive stress, together with immunomodulatory profiling with PBMC assays) could be used to investigate these neutral, anti- or pro-inflammatory consortia in more detail. Ultimately, it may be possible to manufacture various experimental cheeses with opposing immunomodulatory properties (in theory at least, and on the basis of the above-mentioned data). These would be valuable tools in preclinical models of immune dysregulation diseases (e.g. colitis) and could generate data on the use of customized, fermented dairy foods in the management of immune-related disorders in humans and/or provide specific nutritional support.

Acknowledgements

The present work was funded by the Centre National Interprofessionnel de *l'Economie Laitière* (as part of the EcoDige project 2012-2015), the INRA's CEPIA department and AgroParisTech. We also wish to thank Dr. Joëlle Dupont for providing FM13 and FM 140 strains of *P. camembertii*, Dr. Françoise Rul for providing *S. thermophilus* strains, and Hervé Guillemin for developing and testing the ComptatPétri software during this series of experiments.

References

- Araujo, R., Rodrigues, A. G., & Pina-Vaz, C. (2004). A fast, practical and reproducible procedure for the standardization of the cell density of an *Aspergillus* suspension. *Journal of Medical Microbiology*, 53(8): 783-786.
- Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L., & Cogan, T. M. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, 11(4): 259-274.
- Binetti, A., Carrasco, M., Reinheimer, J., & Suárez V. (2013). Yeasts from autochthonal cheese starters: technological and functional properties. *Journal of Applied Microbiology*, 115(2): 434-44.
- Boylston, T. D., Vinderola, C. G., Ghoddusi, H. B., & Reinheimer, J. A. (2004). Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. *International Dairy Journal*, 14(5): 375-387.
- Burgain, J., Gaiani, C., Cailliez-Grimal, C., Jeandel, C., & Scher, J. (2013). Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* GG in microparticles: Influence of casein to whey protein ratio on bacterial survival during digestion. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 19(0): 233-242.
- Cousin, F. J., Mater, D. D., Foligne, B., & Jan, G. (2011). Dairy propionibacteria as human probiotics: a review of recent evidence. *Dairy science & technology*, 91(1): 1-26.
- Czerucka, D., Piche, T., & Rampal, P. (2007). Review article: yeast as probiotics—*Saccharomyces boulardii*. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 26(6): 767-778
- de Vos, P., Faas, M. M., Spasojevic, M., & Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20(4): 292-302.
- Foligne, B., Nutton, S., Grangette, C., Dennin, V., Goudercourt, D., Poiret, S., & Pot, B. (2007). Correlation between *in vitro* and *in vivo* immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World Journal of Gastroenterology*, 13(2): 236.
- Foligné, B., Dewulf, J., Vandekerckove, P., Pignède, G., & Pot, B. (2010). Probiotic yeasts: anti-inflammatory potential of various non-pathogenic strains in experimental colitis in mice. *World Journal of Gastroenterology*, 16(17): 2134-2145.
- Heidebach, T., Först, P., & Kulozik, U. (2009). Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins. *Food Hydrocolloids*, 23(7): 1670-1677.
- Hoarau, C., Martin, L., Faugaret, D., Baron, C., Dauba, A., Aubert-Jacquin, C., Velge-Roussel, F., & Lebranchu, Y. (2008). Supernatant from *Bifidobacterium* differentially modulates transduction signaling pathways for biological functions of human dendritic cells. *PLoS One*. 3(7):e2753.
- Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2010). *In vitro* human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125(1): 1-12.

- Irlinger, F., & Mounier, J. (2009). Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(2): 142-148.
- Janda, J. M., Abbott, S. L., Khashe, S., & Probert, W. (2002). Phenotypic and genotypic properties of the genus *Hafnia*. *Journal of Medical Microbiology*, 51(7): 575-622.
- Kim, W. S., Ren, J., & Dunn, N. W. (1999). Differentiation of *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* and subspecies *cremoris* strains by their adaptive response to stresses. *FEMS Microbiology Letters*, 171(1): 57-65.
- Kindstedt, P., Caric, M., & Milanovic, S. (2004). Pasta-filata cheeses. In *Cheese: chemistry, physics and microbiology* (pp 251-277). Springer US.
- Krulwich, T. A., Sachs, G., & Padan, E. (2011). Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis. *Nature Reviews Microbiology*, 9(5): 330-343.
- Kumura, H., Tanoue, Y., Tsukahara, M., Tanaka, T., & Shimazaki, K. (2004). Screening of dairy yeast strains for probiotic applications. *Journal of Dairy Science*, 87(12), 4050-4056.
- Lawrence, R. C., Gilles, J., & Creamer, L. K. (1993). Cheddar cheese and related dry-salted cheese varieties. In *Cheese: chemistry, physics and microbiology* (pp. 1-38). Springer US.
- Lay, C., Sutren, M., Lepercq, P., Juste, C., Rigottier-Gois, L., Lhoste, E., & Andrieux, C. (2004). Influence of Camembert consumption on the composition and metabolism of intestinal microbiota: a study in human microbiota-associated rats. *British Journal of Nutrition*, 92(03): 429-438.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, SC. (2010). Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nature Review Microbiology*, 8(3): 171-184.
- Lollo, P. C. B., Cruz A. G., Morato, P. N., Moura, C. S., Carvalho-Silva, L. B., Oliveira, C. A. F., & Amaya-Farfan, J. (2012). Probiotic cheese attenuates exercise-induced immune suppression in Wistar rats. *Journal of Dairy Science*, 95(7): 3549-3558.
- Maccaferri, S., Klinder, A., Brigidi, P., Cavina, P., & Costabile, A. (2012). Potential probiotic *Kluyveromyces marxianus* B0399 modulates the immune response in Caco-2 cells and peripheral blood mononuclear cells and impacts the human gut microbiota in an *in vitro* colonic model system. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(4): 956-964.
- Mounier, J., Monnet, C., Jacques, N., Antoinette, A., & Irlinger, F. (2009). Assessment of the microbial diversity at the surface of Livarot cheese using culture-dependent and independent approaches. *International Journal of Food Microbiology*, 133(1): 31-37.

- Nova, E., Wärnberg, J., Gómez-Martínez, S., Díaz, L.E., Romeo, J., & Marcos, A. (2007). Immunomodulatory effects of probiotics in different stages of life. *British Journal of Nutrition Supplement*, 1:S90-95.
- Psomas, E., Andrighetto, C., Litopoulou-Tzanetaki, E., Lombardi, A., & Tzanetakis, N. (2001). Some probiotic properties of yeast isolates from infant faeces and Feta cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 69(1): 125-133.
- Riedel, C.U., Foata, F., Philippe, D., Adolfsson, O., Eikmanns, B.J., & Blum, S. (2006). Anti-inflammatory effects of bifidobacteria by inhibition of LPS-induced NF-kappaB activation. *World Journal of Gastroenterology*, 12(23):3729-3735.
- Romanin, D., Serradell, M., González-Macié, D., Lausada, N., Garrote, G.L., & Rumbo, M. (2010). Down-regulation of intestinal epithelial innate response by probiotic yeasts isolated from kefir. *International Journal of Food Microbiology*, 140(3): 102-108.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., & Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84(3): 197-215.
- Salque, M., Bogucki, P. I., Pyzel, J., Sobkowiak-Tabaka, I., Grygiel, R., Szmyt, M., & Evershed, R. P. (2012). Earliest evidence for cheese making in the sixth millennium BC in northern Europe. *Nature*.
- Salvia-Trujillo, L., Qian, C., Martín-Belloso, O., & McClements, D. J. (2013). Influence of particle size on lipid digestion and β -carotene bioaccessibility in emulsions and nanoemulsions. *Food Chemistry*, 141(2): 1472-1480.
- Saxelin, M., Lassig, A., Karjalainen, H., Tynkkynen, S., Surakka, A., Vapaatalo, H., & Hatakka, K. (2010). Persistence of probiotic strains in the gastrointestinal tract when administered as capsules, yoghurt, or cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 144(2): 293-300.
- Sharp, M. D., McMahon, D. J., & Broadbent, J. R. (2008). Comparative Evaluation of Yogurt and Low-Fat Cheddar Cheese as Delivery Media for Probiotic *Lactobacillus casei*. *Journal of Food Science*, 73(7): 375-377.
- Solieri, L., Bianchi, A., Mottolese, G., Lemmetti, F., & Giudici, P. (2014). Tailoring the probiotic potential of non-starter *Lactobacillus* strains from ripened Parmigiano Reggiano cheese by *in vitro* screening and principal component analysis. *Food Microbiology*, (38): 240-249.

3. Résultats marquants et conclusion

Les résultats du stress digestif *in vitro* ont permis de mettre en évidence une très bonne résistance des levures et des bactéries à Gram-négatif et ce, aussi bien pour une exposition à l'un des deux stress qu'à la combinaison des deux.

Les bactéries à Gram-positif ont donné des résultats plus contrastés. Elles ont été plus sensibles que les Gram-négatives : l'ensemble des souches *A.arilaitensis*, *B.aurantiacum* et *C.casei* n'ont pas résisté à l'exposition à un stress estomac puis un stress duodénum. Si l'on rentre dans le détail du stress le plus délétère, les conditions de l'estomac sont celles qui sont responsables de la perte de viabilité la plus importante pour les deux première espèces citées, celles-ci conservant encore des cellules viables après exposition aux conditions duodénales. *C.casei*, quant à elle, n'a pas résisté au stress duodéal non plus. Concernant l'espèce *S.equorum* deux souches sur trois ont résisté à la combinaison des stress.

L'inclusion en gel présure a permis aux micro-organismes sensible au stress estomac de maintenir leur viabilité en fin d'exposition au stress. Cependant, cette protection n'a pas été observée dans le cas du stress combiné. Ainsi, la matrice protégerait les micro-organismes contre le stress acide mais pas contre le stress biliaire. Les micro-organismes sensibles au stress acide et résistants au stress biliaire profiteraient donc de l'inclusion dans une matrice.

Les PBMCs nous ont permis de mettre en évidence une diversité de réponse importantes aussi bien intra- qu'inter-souches. En effet, l'ensemble des souches de *B.aurantiacum* et *A.arilaitensis* chez les bactéries à Gram-positif et des souches de *K.lactis* et *D.hansenii* chez les levures ont montré un profil plutôt anti-inflammatoire. En revanche, *C.casei*, *S.equorum* chez les bactéries à Gram-positif, *H.alvei* chez les bactéries à Gram-négatif et *G. candidum* chez les levures, ont montré des profils différents parmi les 3 souches testées au sein de chacune des espèces.

Chapitre 2 : Impact de la croissance en écosystème sur la résistance au stress *in vitro* de micro-organismes fromagers et comparaison avec les conditions de croissance de laboratoire.

1. Présentation de l'article 2 accepté avec révisions dans *Food Microbiology*

L'objectif de cette partie des travaux était de comparer la résistance au stress digestif *in vitro* de micro-organismes d'intérêt fromager (i) cultivés séparément en milieu synthétique, (ii) cultivés en milieu synthétique puis mélangés, (iii) cultivés séparément en milieu synthétique puis mélangés et inclus dans un gel présure, (iv) cultivés en conditions d'affinage réelles. Nous avons ainsi eu accès à des micro-organismes rentrant en contact avec les mêmes stress digestifs mais différant soit par leur mode de croissance, soit par leur environnement lors de la mise en contact. Le protocole a aussi inclus une validation *in vivo* sur modèle murin concernant la condition (iv).

A l'heure actuelle, il existe une petite dizaine de dispositifs permettant de reproduire artificiellement le tube digestif en intégrant son aspect cinétique (pour revue, voir Guerra et al., 2012). La diversité de ces modèles comprend des designs relativement simples (e.g. mono-compartmental comme le Dynamic Gastric Model (Mercuri et al., 2008) mais comprend également des dispositifs très complexes et difficile à prendre en main (e.g. la combinaison des TIM-1 et TIM-2 et ses 8 compartiments couvrant le tractus digestif quasiment au complet avec notamment 4 de ses réacteursensemencés par un microbiote (Minekus et al., 1995 ; Minekus et al., 1999). Le choix de l'utilisation d'un dispositif ou d'un autre est lié aux objectifs de travail. Dans notre cas, le dialogue entre microbiote intestinal et les micro-organismes d'origine fromagère, l'incidence du péristaltisme, ou encore la déconstruction en bouche, n'ont pas été étudiés. Ainsi, nous avons fait le choix de développer notre propre digesteur. Le Digesteur Dynamique Gastro-Intestinal (DIDGI) est constitué de trois compartiments indépendants simulant l'estomac, le duodénum et la suite de l'intestin grêle (jéjunum-iléon). L'ensemble du système est relié à une armoire électronique assurant l'interface entre le dispositif et l'ordinateur. Le pilotage des différents paramètres ainsi que l'affichage des valeurs délivrées par les capteurs est réalisée par le logiciel STORM (Guillemin et al., 2010). Ce dispositif nous permet de contrôler à tout instant : la température, le pH, la composition des fluides digestifs ainsi que le transfert du bol d'un compartiment à l'autre. Le dispositif, entièrement stérilisable, permet de prélever des échantillons dans chacun des compartiments. L'annexe I détaille la composition du DIDGI ainsi que ses paramètres de fonctionnement lors des expérimentations réalisées.

La première partie des travaux nous a permis de constituer deux mélanges de micro-organismes aux potentiels immunomodulateurs opposés et permettant d'obtenir un fromage affiné de type pâte molle. Ces fromages affinés ont ensuite été introduits dans le digesteur selon les mêmes séquences de digestion que les autres conditions listées précédemment. En lien avec la troisième partie des travaux, la capacité de survie des micro-organismes à un stress digestif *in vivo* a été testée grâce à des souris BALB/c au microbiote standardisé.

2. Faits marquants

- ✓ Nous avons conçu et réalisé un digesteur *in vitro* gastro-intestinal dynamique composé de 3 étages.
- ✓ Le simulateur a été utilisé pour caractériser la résistance au stress digestif d'un microbiote fromager cultivé en conditions d'affinage réelles.
- ✓ Les résultats des expérimentations en modèles murins ont confirmé les observations faites *in vitro*.
- ✓ Le pouvoir tampon de la matrice fromagère s'est avéré avoir une importance dans le choix de futurs paramètres de digestion

Survival of cheese-ripening microorganisms in a dynamic simulator of the gastrointestinal tract

Nadège Adouard^{ab}, Laurent Magne^b, Thomas Cattenoz^b, Hervé Guillemin^b, Benoît Foligné^c, Daniel Picque^b, Pascal Bonnarme^{*b}

^a AgroParisTech, Centre de Biotechnologies Agroindustrielles, AgroParisTech INRA, UMR 782 Genie & Microbiologie des Procédés Alimentaires, F-78850 Thiverval Grignon, France

^b INRA, Centre de Biotechnologies Agroindustrielles, AgroParisTech INRA, UMR 782 Genie & Microbiologie des Procédés Alimentaires, F-78850 Thiverval Grignon, France

^c Institut Pasteur de Lille, Lactic acid Bacteria & Mucosal Immunity, Center for Infection and Immunity of Lille UMR 8204, 1 rue du Pr Calmette, BP 245, F-59019 Lille, France

* Corresponding author Pascal BONNARME; pascal.bonnarme@grignon.inra.fr Phone: +33 130 815 388

Abstract

A mixture of nine microorganisms (six bacteria and three yeasts) from the microflora of surface-ripened cheeses were subjected to *in vitro* digestive stress in a three-compartment "dynamic gastrointestinal digester" (DIDGI). We studied the microorganisms (i) grown separately in culture medium only (ii) grown separately in culture medium and then mixed, (iii) grown separately in culture medium and then included in a rennet gel and (iv) grown together in smear-ripened cheese. The yeasts *Geotrichum candidum*, *Kluyveromyces lactis* and *Debaryomyces hansenii*, were strongly resistant to the whole DIDGI process (with a drop in viable cell counts of less than $< 1 \log \text{CFU.mL}^{-1}$) and there were no significant differences between lab cultures and cheese-grown cultures. Ripening bacteria such as *Hafnia alvei* survived gastric stress less well when grown in cheese (with no viable cells after 90 min of exposure of the cheese matrix, compared with 6CFU.mL^{-1} in lab cultures). The ability of *Corynebacterium casei* and *Staphylococcus equorum* to withstand digestive stress was similar for cheese and pure culture conditions. When grown in a cheese matrix, *Brevibacterium aurantiacum* and *Arthrobacter arilaitensis* were clearly more sensitive to the overall digestive process than when grown in pure cultures. *Lactococcus lactis* displayed poorer survival in gastric and duodenal compartments when it had been grown in cheese. *In vivo* experiments in BALB/c mice agreed with the DIDGI experiments and confirmed the latter's reliability.

Keywords

Smear-cheese microflora, cheese, *in vitro* model of digestion, murine *in vivo* model

1. Introduction

Cheese is one of the oldest ways of conserving milk: in Northern Europe, evidence of cheese-making activity has been found at sites dating from the sixth millennium BC (Salque et al, 2012). At present, Europe produces around 9000 thousand tons of cheese per annum (Eurostat, 2013), and Europeans eat between 25 and 30 kg of cheese per capita per annum. Given that a gram of cheese contains 10^8 to 10^9 living microorganisms on average (Beresford et al. 2001), the annual intake of viable cells can be estimated at 10^{13} to 10^{14} per capita per annum. The complexity of microflora depends on the type of cheese. In Cheddar and mozzarella, the microflora is relatively simple and consists mainly of lactic acid bacteria (LAB) and a few species of yeast (Kindstedt et al. 2004; Lawrence et al. 2004). In contrast, the microflora in soft, smear-ripened cheeses such as Livarot or Munster contains a broad, diverse range of bacteria and yeasts (Bockelmann 2002, Irlinger and Mounier, 2009). Thus, a fermented food product like cheese is an important source of diverse microorganisms in the human diet. However, few studies have investigated the survival of the cheese microflora in the gastrointestinal tract. A review of the literature shows that most of the research in this field has focused on Lactobacilli, Bifidobacteria and Propionibacteria (Cousin et al. 2011, Saarela et al. 2000) with a view to find new probiotics or using cheese as a carrier for known probiotics (Gardiner et al. 1999, Saxelin et al. 2010).

It has been reported that pH is the major stress factor in the gastric compartment, whereas the presence of enzymes has a negligible effect on the microorganisms (Sumeri et al. 2012). The impact of the stomach's hydrochloric acid (HCl) on both Gram-positive and Gram-negative bacteria has been well characterized (Krulwich et al. 2011). In contrast, the impact of bile has been less documented (Begley et al. 2005) and has focused on food-borne pathogens (e.g. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* (Merrit et al. 2009)) or probiotic candidates (such as the Bifidobacteria and the Lactobacilli (Ruiz et al. 2013)). One of the few studies related to cheese-ripening bacteria found that the genus *Corynebacterium* survived passage through the gastrointestinal tract in human microbiota-associated rats (Lay et al. 2004). Cheese-ripening yeasts (such as *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis* and *Geotrichum candidum*) were found to be able to survive *in vitro* challenges with acid and bile (Kumura et al. 2004, Lay et al. 2004, Psomas et al. 2001). A recent study of the human gut microbiome by David et al. 2014 showed that live bacteria and fungi from cheese are present and metabolically active in the distal colon. This novel approach to assessing the potential impact of food-related microorganisms and their ability to reach the distal colon needs to be consolidated.

Furthermore, Plé et al.'s work (2014, *in press*) on the potential immunomodulatory effect of the microorganisms selected in this study, sought to develop experimental cheeses with bacteria and yeasts that have opposite immune potentials and then studied their impacts in a mouse colitis.

As the interest in whether food microorganisms are able to withstand digestive stress grows, many batch-based models of *in vitro* digestion have been developed (for a review, see Hur et al. (2010)). Several “dynamic” models (intended to reproduce the time course of digestion) have also been designed (for reviews, see Guerra et al. 2012, Ménard et al. 2013). In fact, *in vivo* studies in animal models are quite expensive and intricate to perform. In contrast, *in vitro* models offer greater reproducibility, few ethical issues and the ability to collect samples throughout the experiments. Dynamic models take account of the time course of digestion, the pH profiles at each stage, the transfer between compartments and the progressive addition of digestive juices and other components (e.g. bile, enzymes and electrolytes). After reviewing the literature, we found only two recent studies (Pitino et al. 2012, Sumeri et al. 2012) dealing with the survival of cheese-grown microorganisms namely lactic acid bacteria (LAB) - in pasta filata and semi-hard cheeses, respectively - in a dynamic *in vitro* system. Use of a smear-ripened cheese model (Mounier et al. 2009) would thereby provide novel, relevant information on the little-studied field of cheese microorganisms and dynamic *in vitro* models of digestion. Building on the results of our previous batch-based screening experiments [Adouard et al. 2014 submitted], we adapted the “dynamic gastrointestinal digester” (“DIDGI”) designed and developed by the French National Institute for Agricultural Research (*Institut National de la Recherche Agronomique*) (Ménard et al. 2013). This computer-controlled digester focuses on the upper parts of the digestive tract, i.e. the stomach, duodenum and small intestine. It reproduces the pH profile and the time course of emptying in each compartment, the sequential addition of digestive juices and the stirring of the compartments' contents.

We adapted a model of a smear-ripened cheese ecosystem (Mounier et al. (2008)) containing five bacteria and three yeasts from the surface microflora plus a lactic acid bacteria used as a starter. We compared the microbiota's resistance to dynamic *in vitro* digestive stress under three different conditions, in which the microorganisms were (i) grown separately in culture medium only (ii) grown separately in culture medium and then mixed, (iii) grown separately in culture medium and then included in a rennet gel and (iv) grown together in smear-ripened cheese. A series of experiments using BALB/c mice were also performed, in order to obtain data on the selected strains' ability withstand full digestive transit in an *in vivo* model.

2. Material and Methods

2.1 Microorganisms

The mixture of six bacterial strains and three yeast strains studied here (Table 1) was chosen on the basis of the smear-ripened cheese microbiota described by Plé et al. 2014 (*in press*).

Table 6: List of the microbial strains and growth conditions used in the present study

Species	Strain	Origin	Medium	Growth conditions
<i>Lactococcus lactis</i>	S3	Cheese	M17	30°C - static
<i>Brevibacterium aurantiacum</i>	ATCC 9174	Cheese (Romadur)	BHI	25°C – 250 rpm
<i>Corynebacterium casei</i>	1-3b	Cheese (Livarot)	BHI	25°C – 200 rpm
<i>Arthrobacter arilaitensis</i>	Re 117 ^T	Cheese(Reblochon)	BHI	25°C – 200 rpm
<i>Hafnia alvei</i>	920	Cheese	BHI	25°C – 200 rpm
<i>Staphylococcus equorum</i>	Mu206	Cheese (Munster)	BHI	25°C – 200 rpm
<i>Debaryomyces hansenii</i>	CLIB 623	Cheese	PDB	25°C – 200 rpm
<i>Kluyveromyces lactis</i>	CLIB 683	Cheese	PDB	25°C – 200 rpm
<i>Geotrichum candidum</i>	ATCC 204307	Cheese (Pont-l'Évêque)	PDB	25°C – 200 rpm

2.2 Growth and plate count media

All growth media were purchased from Biokar Diagnosis (Beauvais, France), with the exception of potato dextrose broth (PDB: Difco, Pessac, France). With the exception of LAB, all bacteria were cultured in 100 mL of brain heart infusion (BHI) broth in 500 mL Erlenmeyer flasks at 25°C, with shaking at 200 rpm. The LAB *Lactococcus (Lc.) lactis subsp. lactis* was cultured in M17 medium in 100 mL Schott bottles at 30°C. Yeasts were grown in 100 mL of PDB in 500 mL Erlenmeyer flasks at 25°C, with shaking at 200 rpm. All strains were grown until they had reached the late stationary phase, as determined in previous time course experiments (data not shown).

Bacteria were counted on the same agar based media used for liquid cultures, i.e. BHI agar for strains grown in BHI broth. Eukaryotes were plated on yeast extract glucose chloramphenicol (YEGC) plates. The incubation temperatures were the same as in broth cultures.

The bacteria and yeast have specific and distinct colonies' shapes and morphologies when grown in their respective agar medium (e.g. M17 for *L.lactis*, BHI for the ripening bacteria and YEGC for yeasts). Therefore, we were able to differentially count all of them using the three above-mentioned agar media, even though several species were present in the same Pétri dish.

Prior to plating, cultures were diluted in Maximum Recovery Diluent (MRD, containing NaCl and peptones, 9 g.L⁻¹) (Difco, Pessac, France).

2.3 Rennet gel inclusion of microorganisms

The rennet gel matrix used for microorganism inclusion was produced in a two-step procedure. First, 0.2 mL of a 10 g.L⁻¹ CaCl₂ solution was added to 225 mL of commercial, pasteurized semi-skimmed milk (Lactel, Laval, France) and preheated for 30 min at 32°C. Secondly, 25 mL of a mixture of all the microorganisms and 0.1 mL of rennet (Naturen 450, containing 555 mg.L⁻¹ of active chymosin, 145 IMCU.mL⁻¹; Chr. Hansen, Arpajon, France) were added to the matrix, which was gently stirred for a few seconds before being left to gel unstirred at 32°C for 40 min.

2.4 Pilot-scale cheese-making

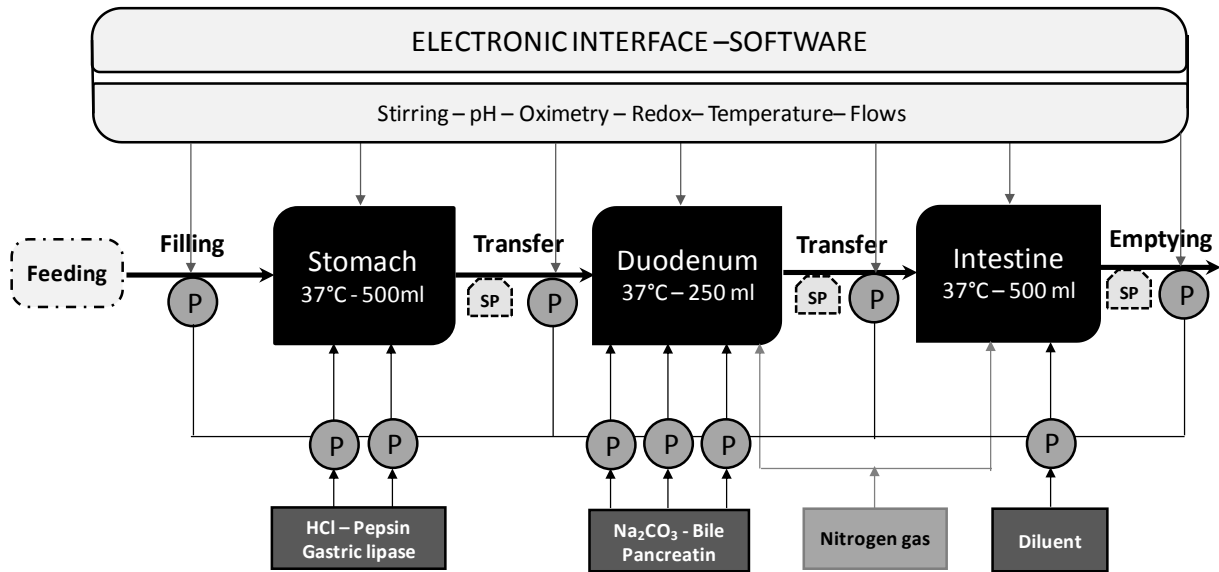
Pilot-scale, aseptic cheese production (namely coagulation, cutting, draining, and molding of the curd) was performed in a 14 L pilot tank, according to the procedures used for Livarot cheese. Pasteurized milk (12 liters) was standardized at 29 g.L⁻¹ fat by mixing semi-skimmed milk and full-fat milk (Alsace Lait, Hœrdt, France). Ten mL of a filter-sterilized 100 g.L⁻¹ CaCl₂ solution was added to the milk and the mixture was pre-heated at 34°C prior to addition of 10⁶ CFU.mL⁻¹ *Lc. lactis*. Once the milk's pH had reached 6.3, a mixture of the ripening bacteria and yeasts was added (yielding final concentrations of 10⁶ and 10⁴ CFU.mL⁻¹, respectively, for each kingdom). Next, filter-sterilized rennet (Naturen, Chr. Hansen, Arpajon, France) containing 520 mg.L⁻¹ of active chymosin was added (0.3 mL.L⁻¹ of milk). After 20 min of coagulation at 34°C and 30 min of hardening, the curds were cut and then stirred for 5 min at 10 stirs.min⁻¹. After the curd had stood for 15 min, 6.5 L of whey were removed prior to molding. The cheeses were shaped into two circular, polyurethane molds (200 x 150 x 40 mm) and weighed approximately 900 g each. The molds were then stored at 20°C and inverted four times (30 min, 2.5 h, 6 h, and 22 h after the molding step). Twenty-four hours after molding, the cheese curds were removed from the mold. After standing for two hours, the cheeses were cut into circular pieces (diameter: 50 mm; thickness: 15 mm; weight: approximately 20 grams).

Hence, 32 small cheeses were obtained and placed in a sterile environment at 14°C and 97% relative humidity for a 28-day ripening period. All nine bacteria and yeasts were able to grow in the cheese. The concentration of each species in the final, ripened cheeses is given in Table S1.

2.5 The *in vitro* digestive challenge

2.5.1 The dynamic *in vitro* simulator of gastrointestinal digestion

The original DIDGI digester (Ménard et al. (2013)) comprised two compartments (a stomach and a duodenum/small intestine). We decided to add a third compartment (Figure 1) by separating the duodenum from the small intestine, since these compartments are known to have different volumes, fluid compositions and transit times *in vivo*. Each compartment was surrounded by a glass jacket filled with temperature-controlled water, enabling us to mimic the human's physiological body temperature (37°C). Each glass vessel was equipped with temperature, pH and redox sensors (Electrode InPro 4801i/SG/120, reference 52003581, Mettler Toledo, Viroflay, France) and computer-controlled peristaltic pumps (Verder, Eragny-Sur-Oise, France) for controlling the various inflows (HCl, Na₂CO₃, bile and enzymes) and transferring the meal from one compartment to the next. A Teflon membrane (pore size: 2 µm) was placed between the gastric and the duodenal compartment, in order to mimic the sieving effect of the pylorus (Kong & Singh (2008)). A sampling device was placed at the outlet of each compartment. Anaerobic conditions were simulated by flushing out the air with nitrogen gas. In each experiment, 50 mL of MRD was added to 100 g of broth culture, rennet gel or cheese, in order to mimic the effect of dilution by the saliva. Therefore, 150 mL of simulated food bolus were introduced into the gastric compartment. In the first phase of our study, the simulated food consisted of a broth culture of each of the selected microorganisms alone. We then worked with a mixture of all nine selected microorganisms (*i.e.* cultured separately in broth and mixed immediately before the experiment). Thirdly, tests were carried out using the rennet gel-included mixture of the microorganisms that had been identified in a smear-ripened cheese mix (Plé et al. 2014, in press). Lastly, smear-ripened ripened cheese was used in the final set of experiments.

Figure 1: Block diagram of the Digesteur Dynamique Gastro-Intestinal (DIDGI).

P: peristaltic pump; SP: sampling pump.

2.5.2 Computer software and mathematical modeling

The DIDGI's parameters were based on a review of the literature on digestion in humans and pigs. Secretion rates and volumes and the nature and quantity of enzymes in the DIDGI's various compartments were based on previous *in vivo* studies (Blanquet et al., 2004, Bouzerzour et al., 2012 and Minekus, 1995). The pH curve in the stomach was obtained by combining data from *in vivo* studies in humans and in piglets (Calbet et al. 2004 Chiang et al., 2008, Moughan et al., 1991). For the experiments with culture broth alone, the pH in the gastric compartment was defined as $-0.063 \times t + 6.5$ until it reached pH 2. The latter value was then maintained until the end of the experiment. Since the pH of the model cheeses was slightly higher than that of broth, the pH was controlled in two steps: $\text{pH} = -0.11 \times t + 7.5$ from $t = 0$ min to $t = 10$ min, and then $\text{pH} = -0.063 \times t + 6.5$ until it reached pH 2. Again, the latter value was then maintained until the end of the experiment. The pH of the duodenum compartment was kept constant at 6.5. The variables $t_{1/2}$ and β reflect the transit time of the bolus in the stomach and the duodenum and were adapted from Minekus (1995): we used $t_{1/2} = 70$ min ; $\beta = 2$ for gastric transfer and $t_{1/2} = 120$ min ; $\beta = 1.8$ for duodenal transfer. Table 2 summarizes the parameters used during a DIDGI run.

Table 7 : Composition and flow rates of the various inputs used in the DIDGI experiments

Compartment	Input	Constituents	Origin	Concentration/quantity of the input	Flow rate (mL.min ⁻¹)	Time lapse (min)
Stomach	Culture/Matrix/Cheese + maximum recovery diluent as "saliva"	Microorganisms + Peptone/NaCl	-	100 g + 50 g (9.5 g.L ⁻¹)	15	[0;10]
	HCl	-	Chemical	1 mol.L ⁻¹	pH regulation	-
	Gastric enzymes	Pepsin	Porcine	0.5 g.L ⁻¹ (~2000 U.mL ⁻¹)	0.4	[10;90]
		Gastric lipase	Recombinant	6.5 g.L ⁻¹ (~200 U.mL ⁻¹)		
Duodenum	Na ₂ CO ₃	-	Chemical	1 mol.L ⁻¹	pH regulation	-
	Bile 40	Bile	Porcine	40 g.L ⁻¹	0.5	[0;80]
	Bile 20	Bile	Porcine	20 g.L ⁻¹	0.15	[80;100]
					0.2	[80;220]
	Pancreatin	Pancreatin	Porcine	9 g.L ⁻¹	0.25	[0;50]
					0.1	[50;220]
Intestine	Diluent	Peptone	Chemical	9.5 g.L ⁻¹	0.8	[20;100]
		NaCl			0.5	[100;250]

Data on the change over time in the various compartments' volumes are given in the supplemental data section (Figure S1). Data collected in the above-mentioned *in vivo* studies (such as the quantity of ingested food, the meal duration, the pH curves for the stomach and small intestine, the secretion rates into the different compartments and the gastric and small intestine emptying) were fed into the *STomach Regulation and Monitoring* software package (Guillemin et al. 2010). A power-exponential model for gastric and intestinal delivery was used (Elashoff et al. 1982) to control the chyme's transit time in each compartment:

$$f = 1 - 2^{-\left(\frac{t}{t_{1/2}}\right)^\beta}$$

Where *f* is the fraction of chyme remaining, *t* is the time, *t*_{1/2} is the half-emptying time and β is a coefficient that describes the shape of the curve. The pH values were computer-controlled by injecting either 1 M HCl to decrease the pH in the stomach or 1 M Na₂CO₃ to raise the pH in the small intestine.

All digestive juice components were purchased from Sigma (Saint-Quentin-Fallavier, France) and diluted in MRD. Pepsin (P6887, EC 3.4.23.1, activity: 3300 U.mg⁻¹ of protein, calculated using hemoglobin as a substrate), pancreatin (P1750), and bile (B8631) were of porcine origin. The "gastric lipase" was a recombinant enzyme produced in the fungus *Rhizopus oryzae* (80612, EC 3.1.1.3, activity: ≥30 U.mg⁻¹). After rehydration, the enzymes were kept on ice throughout the experiment, in order to avoid autolysis. Digestion experiments were performed in duplicate and samples from each compartment were collected throughout the experiment.

2.6 The *in vivo* digestive challenge

2.6.1 *Animal care and use and ethical aspects*

Ten BALB/c female mice (aged 7 weeks on arrival) were obtained from Charles River (Saint-Germain-sur-l'Arbresle, France). The animals were housed in a controlled environment (with a temperature of 22°C, a 12 h/12 h light/dark cycle and *ad libitum* access to food and water). All animal experiments were performed according to the guidelines of the Institut Pasteur de Lille Animal Care and Use Committee and complied with the Amsterdam Protocol on Animal Protection and Welfare and the Directive 86/609/EEC on the Protection of Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (updated in the Council of Europe's Appendix A). The animal work was also compliant with French legislation (the French Act 87–848, dated 19-10-1987) and the European Communities Amendment of Cruelty to Animals Act 1976. The study's objectives and procedures were approved by the local Ethics and Welfare Committee for Experiments on Animals in France (Nord-Pas-de-Calais region; approval number: 19/2009R and 21/2009R).

2.6.2 *Assessment of the survival of ripening microflora*

Ten mice were given 1 g of the cheese via the intragastric route. This procedure was performed daily (in the late afternoon) for five consecutive days. On each of the first three days, feces were collected eight hours after feeding. Feces were also collected after a seven-day washing period. The fecal samples were dissolved in MRD and plated on BHI agar or PDA medium for counting bacteria and yeasts, respectively. The results were expressed as the mean $\pm$ standard deviation for the group of 10 animals for each of the three consecutive days of feces collection.

3. Results

3.1 *In vitro* experiments: pure culture

The ability of the nine cheese-ripening microorganisms (six bacteria and three yeasts) to withstand *in vitro* digestive stress was tested in the DIDGI under three different conditions. We would like to emphasize the fact that the main characteristic of the DIDGI is its “dynamic” approach of the digestive process. Indeed, the bolus introduced in the gastric compartment starts its journey to the duodenum while the artificial stomach still contains sample, as it occurs during *in vivo* digestion. It goes alike with the transfer between the duodenal and the intestinal compartment. Figure 2 displays the viability curves for the six selected bacteria during transit through the DIDGI's gastric, duodenal and small intestine compartments when administered as pure cultures. In order to compensate for the effect of the added components, the data on viability was corrected by a dilution factor according to the residence time in each compartment. Data on the change over time in the yeasts' viability are given in the supplemental data section (Figure S2).

It is to note that no morphological change in the shape of the colonies was observed throughout the experiments. It enabled us to keep the same numeration method disregarding the stage of the *in vitro* digestion process.

3.1.1 The gastric phase

Both *H. alvei* and *Lc. lactis* displayed strong resistance to gastric stress (Figure. 1A). *H. alvei* did not become less viable until the pH reached 2.5 (after 60 min). The count of 9 log CFU.mL⁻¹ then fell to 6 log CFU.mL⁻¹ at 90 min and remained relatively constant until the gastric compartment had emptied completely at 110 min. *Lc. lactis* also remained viable for 60 min, although the decrease was sharper than for *H. alvei*; viability had fallen to 4 log CFU.mL⁻¹ at the end of the gastric phase. *B. aurantiacum*, *S. equorum* and *C. casei* were much more sensitive to gastric stress and displayed similar changes over time in viability. The viability started to decrease after 40 min of exposure to gastric stress (pH 4), and then fell rapidly to zero after 70 min for *C. casei* and 80 min for the other two species. Lastly, the viability of *A. arilaitensis* started to fall from the beginning of the gastric phase onwards, with a decrease of 1 log CFU.mL⁻¹ every ten minutes over the first 40 min and a value of zero after 50 min.

All the yeasts were strongly resistant to gastric exposure, since *G. candidum* and *D. hansenii* did not show any changes in viability. The *K. lactis* count fell by just 1 logCFU.mL⁻¹ over the duration of the experiment (Figure S2).

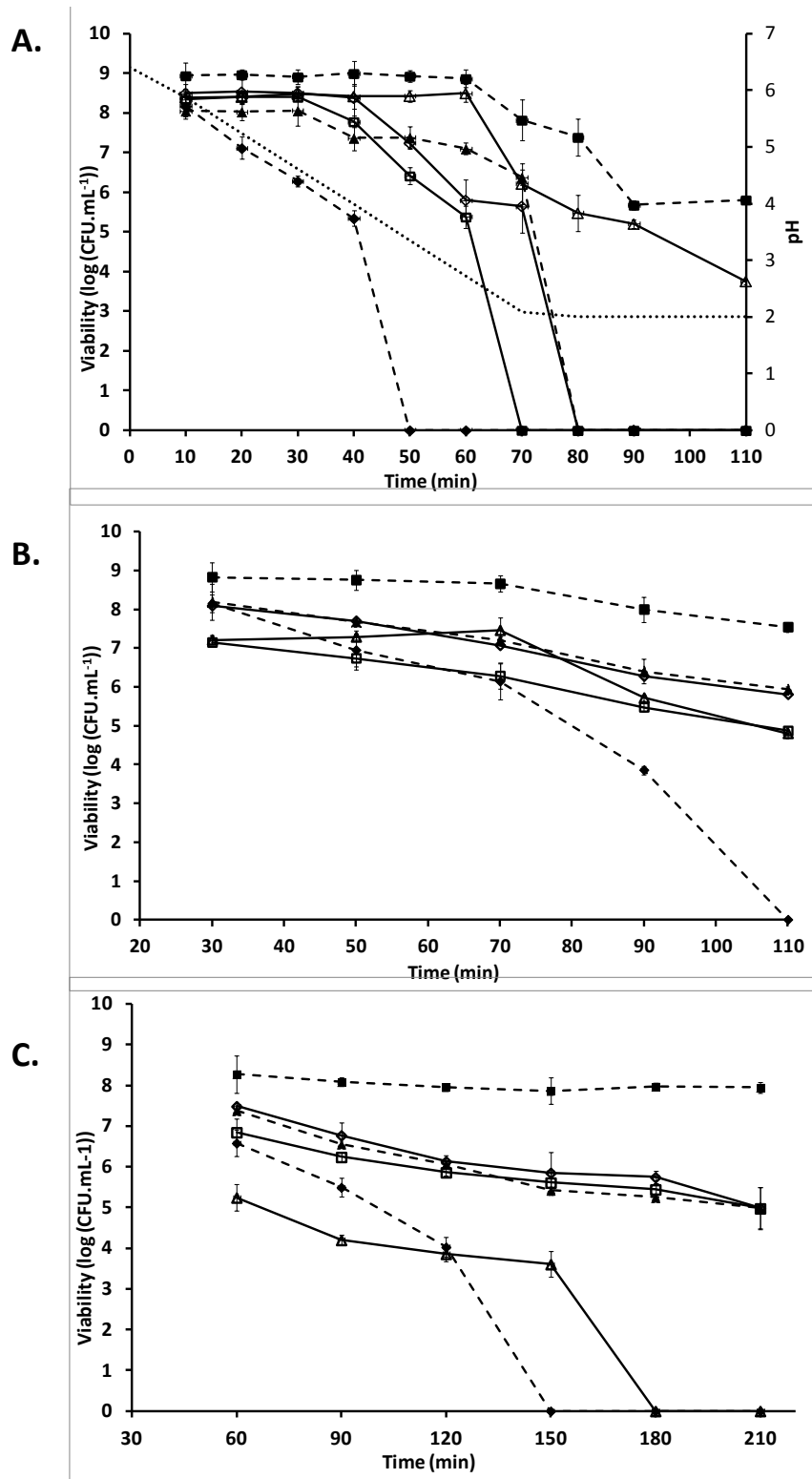


Figure 2 : Effect of in vitro dynamic, simulated digestion on the viability of the selected smear-ripened cheese micro-organisms. (A) the gastric compartment; (B) the duodenal compartment; (C) the small intestine compartment. Inoculation levels in the gastric compartment are given between brackets. *Brevibacterium aurantiacum* (◇, solid line, 8.5 log CFU/mL); *Corynebacterium casei* (□, solid line, 8.3 log CFU/mL); *Lactococcus lactis* (Δ, solid line, 8.4 log CFU/mL); *Arthrobacter arilaitensis* (◆, dotted line, 8.2 log CFU/mL); *Hafnia alvei* (■, dashed line, 8.9 log CFU/mL); *Staphylococcus equorum* (▲, dashed line, 8.1 log CFU/mL).

The pH in the gastric compartment is plotted as a dotted line against the right-hand axis.

3.1.2 The duodenal phase

H. alvei also showed strong resistance to the duodenal conditions (Figure. 2B). Its viability level did not change over the first 40 min and then fell from 8.7 log CFU.mL⁻¹ to 7.5 log CFU.mL⁻¹ by the end of the experiment (110 min). The initial viability level of *Lc. lactis* (7.2 log CFU.mL⁻¹) remained constant over 70 min of exposure and fell to a value of 4.8 log CFU.mL⁻¹ by 110 min. *B. aurantiacum* and *S. equorum* displayed similar viability curves; the counts fell steadily from 8.2 log CFU.mL⁻¹ at the beginning of the duodenal phase to 6.0 log CFU.mL⁻¹ by the end. *C. casei* displayed a similar pattern, except that the initial value of 7.0 log CFU.mL⁻¹ had fallen to 5 log CFU.mL⁻¹ by the end of the duodenal phase. The initial viability level of *A. arilaitensis* was 8 log CFU.mL⁻¹. This value fell by almost 2 log CFU.mL⁻¹ over the first 40 min of duodenal exposure and was zero at the end of the experiment. As seen in the gastric compartment, the yeasts viability was not affected by the duodenal phase of the experiment. The counts of *G. candidum*, *K. lactis* and *D. hansenii* remained constant (at 3.8, 6.5 and 6.0 log CFU.mL⁻¹, respectively) throughout the duodenal phase.

3.1.3 The small intestine phase

We observed three different bacterial viability profiles in the small intestine phase. The viability of *H. alvei* remained constant, at 8.5 log CFU.mL⁻¹. *S. equorum*, *B. aurantiacum* and *C. casei* displayed a viability value of 7.0 log CFU.mL⁻¹ at the beginning of the small intestine phase and fell to a value of 5 CFU.mL⁻¹ by the end. The viability of *A. arilaitensis* and *Lc. lactis* had fallen to zero by the end of the small intestine phase. However, *Lc. lactis* survived for at least 150 min, whereas *A. arilaitensis* viability fell to zero after 120 minutes. As seen in the gastric and duodenal compartments, the yeasts' viability remained constant throughout the small intestine phase, with values of 3.5, 6.5 and 6.2 log CFU.mL⁻¹ for *G. candidum*, *K. lactis* and *D. hansenii*, respectively.

3.1.4 Overall DIDGI process

Overall, the yeasts appeared to be strongly resistant to the stress encountered in the DIDGI's three compartments. Indeed, between the start of the gastric phase and the end of the small intestine phase, none of the yeasts lost more than 1.5 log CFU.mL⁻¹ in viability. The counts were fairly high at the end of the experiment as a whole (3.5, 6.5 and 6.2 log CFU.mL⁻¹ viable cells for *G. candidum*, *K. lactis* and *D. hansenii*, respectively). When considering the bacteria, *H. alvei* was extremely resistant to the overall process and only lost 1 log CFU.mL⁻¹ in viability between the first sample in stomach and the last sample in the small intestine. *S. equorum*, *C. casei* and

B. aurantiacum were fairly resistant, since live cells were still present at the end of the experiment. In contrast, *Lc. lactis* and *A. arilaitensis* did not withstand the *in vitro* digestive process.

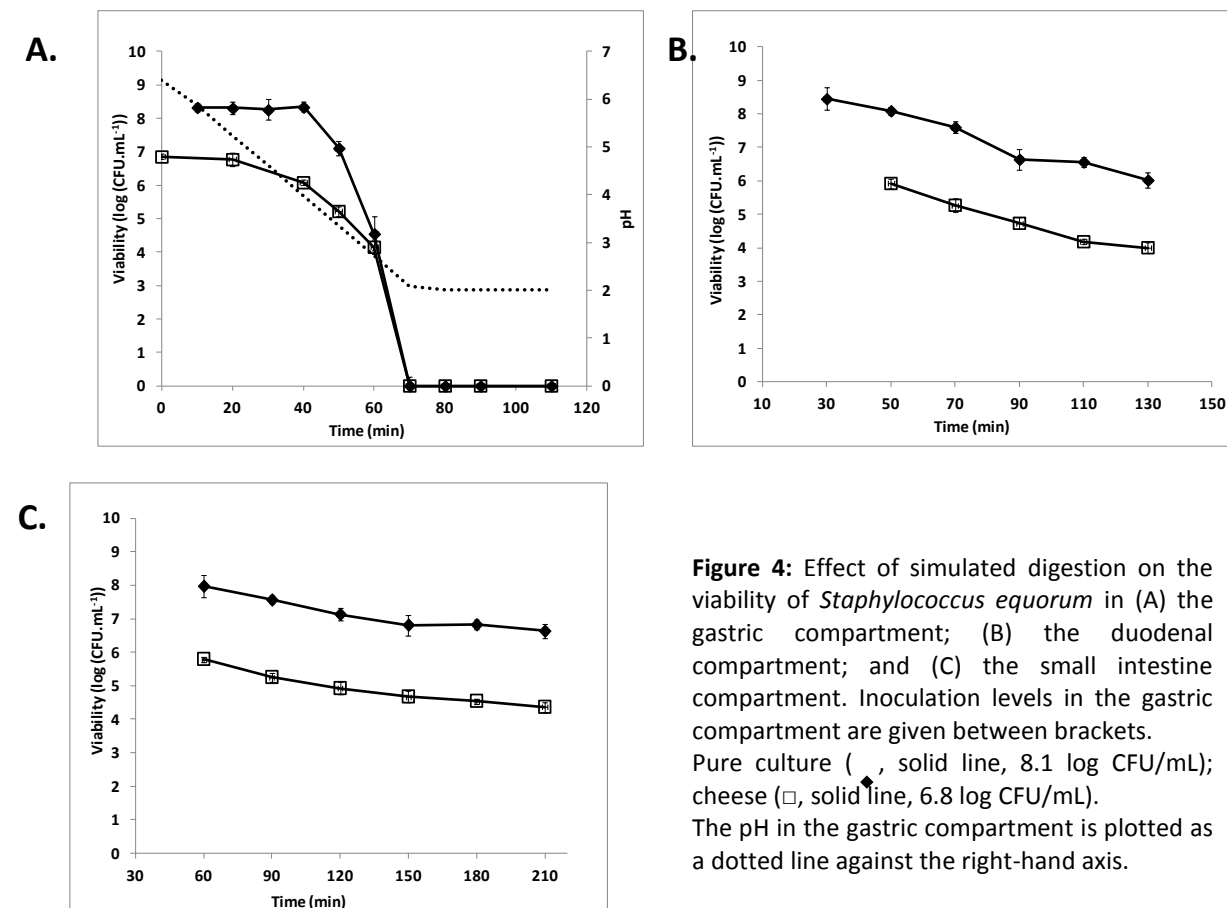
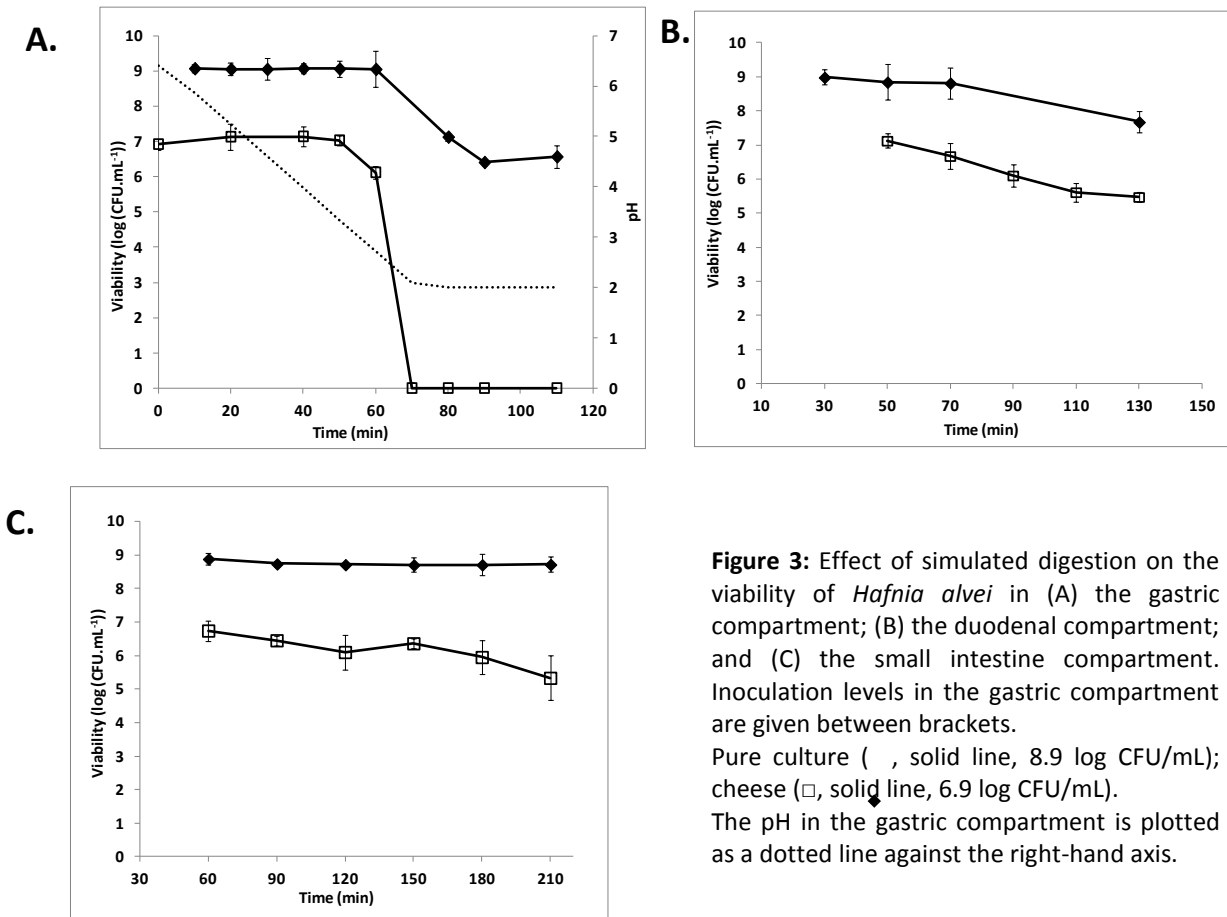
3.2 In vitro experiments: a liquid mixture of microorganisms and a rennet gel inclusion

Importantly, we found that mixing the nine bacteria and yeasts immediately before the beginning of the DIDGI experiment or including this mixture in a rennet gel did not change the species' viability patterns in any of the compartments, when compared with the pure individual cultures described above (data not shown) every other things being equals (i.e. DIDGI parameters, sampling time, plating and count method).

3.3 In vitro experiments with cheese

We next sought to assess the influence of growth in a simplified but realistic smear-ripened cheese environment on the microorganisms' abilities to withstand digestive stress, relative to a mixture of the 9 microorganisms in broth.

Figure 3 compares the viability of *H. alvei* in pure cultures and cheese-grown conditions for the DIDGI's three compartments. The starting concentration was higher for the pure-culture condition than for the cheese condition. For the cheese condition (Figure 3A), the viability in the gastric compartment remained constant for 50 min and then started to dropped to zero over 70 minutes. As mentioned above, the viability of the pure-culture condition was still above 6 log CFU.mL⁻¹ at the same time point; *H. alvei* was less resistant to gastric conditions when grown in cheese than in a pure culture. In the duodenal compartment (Figure 3B), the pure culture and cheese conditions displayed the same changes over time in viability. Likewise, the viability in both conditions remained stable in the small intestine compartment (Figure 3C). The slightly lower viability for the cheese condition (less than 1 log CFU.mL⁻¹) was not statistically significant (as judged by the standard deviations). In the case of *S. equorum* (Figure 4), the change over time in viability was the same for the pure culture and cheese conditions in all three compartments. Hence, growth in cheese conditions did not appear to change *S. equorum*'s ability to resist *in vitro* digestive stress in the DIDGI.



The change over time in *G. candidum*'s viability in the three compartments differed slightly when comparing the pure culture condition with the cheese condition (Figure 5). From 60 min to the end of gastric exposure, the viability level in the cheese condition dropped from 6.5 log CFU.mL⁻¹ to 4.5 log CFU.mL⁻¹, whereas that of the pure culture conditions was unchanged (Figure 5A). In the duodenal phase (Figure 5B) and the small intestine phase (Figure 5C), *G. candidum*'s viability in the pure culture condition was stable. In contrast, the viability *G. candidum* in the cheese condition fell from 5.8 log CFU.mL⁻¹ to 3 log CFU.mL⁻¹ at the end of the duodenal phase and from 5.8 log CFU.mL⁻¹ to 4 log CFU.mL⁻¹ at the end of the small intestine phase. In light of these findings, *G. candidum* appears to be more sensitive to digestive stress when it is grown in cheese than in a pure culture.

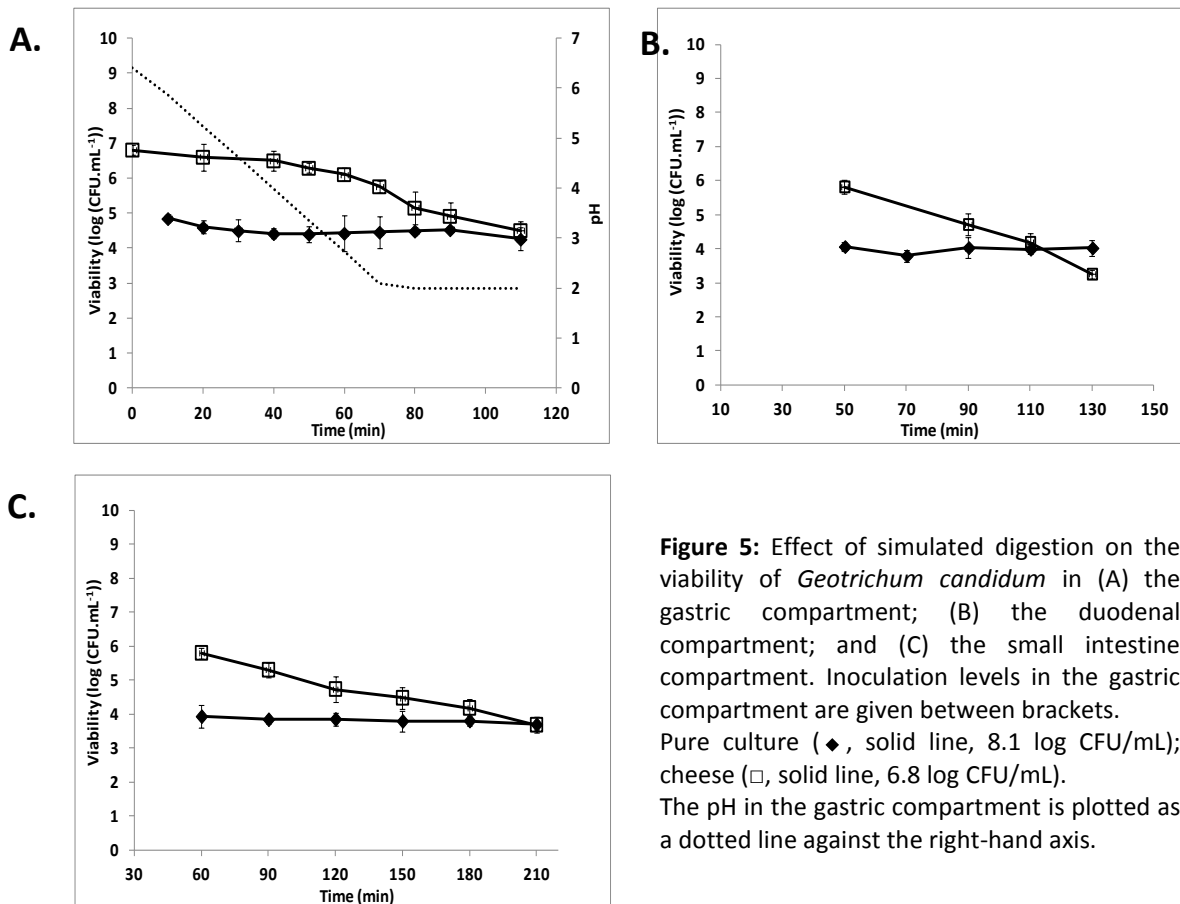


Figure 5: Effect of simulated digestion on the viability of *Geotrichum candidum* in (A) the gastric compartment; (B) the duodenal compartment; and (C) the small intestine compartment. Inoculation levels in the gastric compartment are given between brackets. Pure culture (◆, solid line, 8.1 log CFU/mL); cheese (□, solid line, 6.8 log CFU/mL). The pH in the gastric compartment is plotted as a dotted line against the right-hand axis.

The viability of *C. casei* (Figure S3) for pure-culture and cheese conditions displayed the same patterns in the DIDGI's three compartments. The gastric-phase viability of *B. aurantiacum* (Figure S4) in cheese fell from 6 log CFU.mL⁻¹ to less than 3 log CFU.mL⁻¹ (i.e. below the detection limit of the plating method) within 50 min, whereas the value in a pure culture took 80 min to drop from 8.5 log CFU.mL⁻¹ to less than 3 CFU.mL⁻¹. Although the viability of a pure culture fell during the duodenal and small intestine phases, the final concentration of live cells was still significant at the end of the experiment 6.5 log CFU.mL⁻¹ at 210 min in the small intestine compartment.

In the cheese condition, *B. aurantiacum*'s viability had fallen to zero long before the end of the experiment. *Lactococcus lactis*' viability (Figure S5) in gastric conditions fell to zero within 60 min for cheese but remained above $3.5 \log \text{CFU.mL}^{-1}$ in the pure culture condition. The duodenal phase led to complete loss of viability for *Lc. lactis* in cheese, whereas a pure culture still displayed a value of $5 \log \text{CFU.mL}^{-1}$ at the end of the phase. Lastly, both cheese and pure cultures contained viable *Lc. lactis* cells at the end of the small intestine phase $3.5 \log \text{CFU.mL}^{-1}$ and $5 \log \text{CFU.mL}^{-1}$, respectively. In summary, the culture conditions of *K. lactis* and *D. hansenii* did not significantly affect the change over time in viability when the yeasts were exposed to digestive stress in the DIDGI. In contrast, *G. candidum* appeared to be slightly more sensitized when grown in cheese. This was also the case for bacteria such as *H. alvei* (albeit in the gastric phase only). *Corynebacterium casei*'s and *S. equorum*'s respective abilities to withstand digestive stress were not modified by growth in cheese, relative to growth in broth. *Brevibacterium aurantiacum* was clearly more sensitive to the overall digestion experiment when grown in cheese than when grown in pure culture. This was also the case for *A. arilaitensis*. *Lactobacterium lactis* was more sensitive to the conditions in the gastric and duodenal compartments when grown in cheese.

3.4 Acid curves

Since acid is likely to be a significant stress factor, we monitored the addition of HCl during each experiment. The DIDGI was set up so that the pH curve was the same for experiments with pure cultures, the rennet-gel inclusion and the cheese matrix. Figure 6 clearly shows that the quantity of HCl varied markedly from one condition to another; the final volumes were 3.5 mL, 11 mL and 50 mL for the pure culture, the rennet gel and cheese, respectively.

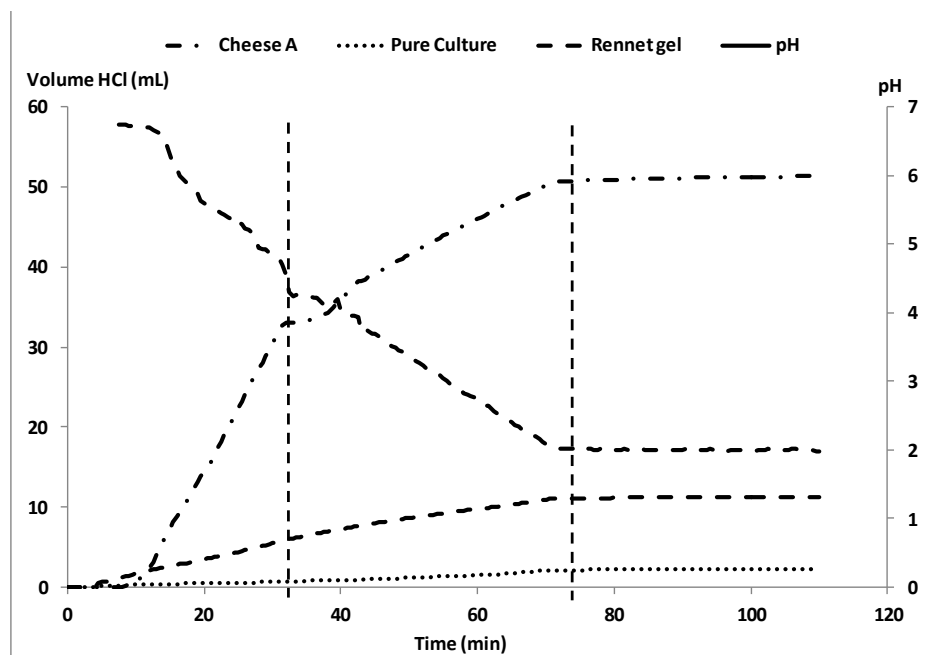


Figure 6 : The change over time in the volume (mL) of 1 M HCl added during the gastric phase of a DIDGI experiment, for each of the three matrixes.

pH (solid line); pure culture (dotted line); rennet gel (dashed-line); cheese (dashed-dotted line)

3.5 *In vivo* experiments with microorganisms grown in pilot-scale cheeses

These experiments were designed to assess the *in vivo* resistance of surface-ripened cheese microorganisms grown in pilot-scale cheeses. In general, it appeared that the microorganisms grown in cheese were able to survive passage through the murine digestive tract (Table 3). With the exception of *Lc. lactis* and *A. arilaitensis*, live bacteria were found in mice feces at counts ranging from almost 4 log CFU.g⁻¹ feces (for *B. aurantiacum*) to 7.5 log CFU.g⁻¹ feces (for *C. casei*). The yeasts also withstood passage through the murine digestive tract: live *D. hansenii*, *G. candidum* and *K. lactis* were all found in the feces at counts close to 4 log CFU.g⁻¹ feces.

Table 8 : Survival of cheese-ripening microorganisms after ingestion by BALB/c mice (n=10)

Microorganisms	Diluted cheese (feeding)	
	Viable cells (log CFU.g ⁻¹)	Feces (8 h) (log CFU.g ⁻¹)
Bacteria		
<i>A. arilaitensis</i> Re117 ^T	5.69 ± 0.09	ND
<i>B. aurantiacum</i> ATCC9174	6.51 ± 0.15	4.29 ± 0.39
<i>C. casei</i> 1-3b	8.52 ± 0.12	7.52 ± 0.25
<i>H. alvei</i> 920	6.61 ± 0.19	5.21 ± 0.29
<i>Lc. Lactis</i> S3	7.04 ± 0.09	ND
<i>S. equorum</i> Mu206	6.32 ± 0.12	5.13 ± 0.32
Yeasts		
<i>D. hansenii</i> CLIB 623	5.93 ± 0.08	4.16 ± 0.56
<i>G. candidum</i> ATCC 204307	6.32 ± 0.30	3.73 ± 0.35
<i>K. lactis</i> CLIB 683	6.42 ± 0.18	4.65 ± 0.20
ND : Not detected		

4. Discussion

Scientific interest in food digestion and nutrient bioavailability has grown rapidly in the last ten years. For example, several new journals dedicated to this new field of research have been launched, and the number of published articles increased dramatically from 400 in 1995 to nearly 1400 in 2013. In this context, the fate of food microbial ecosystems in humans is of a great interest in terms of nutrient availability and potential effects on gut immunity. One of the main objectives of the present work was to evaluate the survival of cheese-ripening microorganisms in conditions that would approximate digestive stress, by using a recently developed *in vitro* digester. Given the broad variety of models described in the literature (Guerra *et al.* 2012), we had to determine which digestive compartments and parameters (e.g. pH, transit time, and digestive juice components) were likely to have an impact on the microorganisms' viability. We therefore designed a three-stage system (modelling the stomach, duodenum and small intestine) and decided to use the same operating parameters for all matrices (i.e. a pure culture, a rennet gel or cheese) in order to compare the respective datasets. Our *in vitro* digestive model was a convenient way of comparing the viability of microorganisms exposed to reproducible stress conditions while changing the input conditions. Overall, a variety of cheese-isolated microorganisms were found to be alive at the end of the DIDGI experiment. It is noteworthy that the gastric compartment produced a greater drop in the microorganisms' viability than the downstream duodenal and small intestine compartments did. This observation suggests that HCl is indeed the most intense stress encountered by microorganisms during the digestive process. Yeasts were strongly resistant to the *in vitro* digestive process as whole, confirming previous studies (Lay *et al.*, 2004, Psomas *et al.*, 2001) in which a selection of *D. hansenii*, *K. lactis* and *G. candidum* strains survived well when exposed to digestive stress. When considering bacteria, the genetic and phenotypic similarities between *E. coli* and *H. alvei* (Janda *et al.*, 2002) prompted us to assume that *H. alvei* would resist digestive stress, as reported in both *in vivo* and *in vitro* experiments. Furthermore, the greater sensitivity to gastric stress observed when *H. alvei* had been grown in cheese may be explained by the poorer availability of some amino acids. Indeed, growth in an ecosystem generates inter-strain competition for nutrients such as glutamic acid. The latter's key role in resistance to acid stress in (among others) Gram-negative bacteria has been widely documented (Krulwich *et al.* 2011). Further research will seek to confirm the presence of this mechanism of action in *H. alvei*. Kim *et al.* (1999) reported that *Lc. lactis* subsp. *lactis* strains were able to survive a pH as low as 2.5 in M17 medium acidified with HCl. The resistance of *Lc. lactis* subsp. *lactis* to the gastric phase of the present study is consistent with the species' physiology and the literature results (i.e. maintenance of viability above pH 2.5).

However, the viability of *Lc. lactis* fell quickly below this pH threshold, highlighting the great effect of a small pH variation when a strain is close to its limit.

As mentioned above, the lack of published studies on the response to digestive stress of the surface-ripened cheese Gram-positive microflora makes it difficult to compare our present results with the literature. However, some information on the response to acid stress can be gleaned from studies of cheese ripening. The work by Bockelman et al. (2002) showed that *S. equorum* is part of the early smear-ripened cheese microflora that is established when the cheese curd is still acidic (pH 5). In contrast, *C. casei* and *B. aurantiacum* start to develop when a pH of 6 is reached. It was therefore not surprising that *S. equorum* was better able to resist a gastric-type challenge than *C. casei* and *B. aurantiacum*, both of which failed to survive this phase.

In contrast to the static model used in our previous studies (Adouard et al. 2014, accepted), the DIDGI's continuous fermentation enabled a certain proportion of otherwise acid-sensitive microorganisms to survive the gastric compartment and pass into the downstream compartments. In dynamic experiments, the stress is applied gradually and so part of the bolus is transferred before the stress becomes stringent. Hence, a proportion of the gastric-sensitive microorganisms are able to stay alive until the end of the experiment if they can resist conditions in downstream compartments. Clearly, this kind of approach models the real digestion process more closely. Indeed, almost all of the microorganisms selected in the present work were able to withstand the full digestive process in the murine gastrointestinal tract. These findings corroborate our initial hypothesis, i.e. that a dynamic *in vitro* model is more accurate than a batch model (even though the former still does fully reproduce what happens *in vivo*).

We originally assumed that the presence of a barrier-like, buffering rennet gel (Upreti et al. 2006) and (especially) cheese-grown microorganisms would enable acid-sensitive strains to better survive the digestive stress. However, our experimental results did not reveal an obvious protective effect. The time course of acidification was the same for all input matrices, which therefore forced the system to add more HCl for matrices with a greater buffering capacity. The hypothesis that a given amount of HCl would be secreted regardless of the nature/amount of the matrix is therefore quite improbable. On the contrary, one can reasonably expect acid secretion in the stomach to be stimulated when the bolus has a higher buffering capacity (as occurred in the DIDGI). This increase raises the question of whether our *in vitro* results faithfully mimic *in vivo* digestion. We therefore calculated the mean acid flow rate and the maximum acid concentration in the gastric compartment in the DIDGI in the presence and absence of the cheese matrix and them with *in vivo* available data (Table 4). We found that the DIDGI's observed acid concentrations and flow rates during cheese experiments exceeded *in vivo* values.

Firstly, the cheese matrix's buffering capacity of the matrix led to an increase in the amount of secreted HCl *in vitro*. Secondly, acid secretion *in vivo* may be influenced by other physiological parameters such as gastric emptying, which is known to be strongly influenced by the nature of the bolus; the thicker the bolus, the slower the gastric emptying (Low et al. 1990).

Table 9: Flow rates and acid concentrations in the stomach *in vivo* and in the DIDGI's gastric compartment.

Physiological data		Experimental data		
Smith and Morton, (2010)		Pure culture	Rennet gel	Cheese
HCl flow rate during acidification (mmol.h ⁻¹)	25	2.1	10	44.6
Maximum HCl concentration (mmol.L ⁻¹)	150	13	51	225

The presence of fat globules and proteins also changes the time course of emptying (Turgeon et al. 2011). Our findings can be compared with those of an interesting study by Gardiner et al. (1998), in which microorganisms included in cheddar cheese and submitted to *in vitro* digestive stress were better protected than those included in yogurt. The researchers' main explanation was based on the cheese's stronger buffering capacity (as a result of a higher peptide concentration than yogurt). However, the study's *in vivo* results failed to evidence a significant difference between cheese and yogurt matrices in terms of their ability to protect microorganisms throughout the digestive process. These various findings prompt us to think that the quantity of HCl in the DIDGI should be fixed and the change over time in the pH should be monitored (rather than the other way around). In fact, the physiological situation is likely a balance between these two means of regulating the stomach's acidity. Indeed, acidification is driven by the stomach's HCl sensors and depends on the nature of the bolus (Smith and Morton 2010). In future research with the DIDGI, we intend to study variations in other parameters (such as the inter-compartment transfer rate) and their relationships with the tested matrix's physical and chemical properties.

Taken as a whole, the present results enabled us to (i) reliably show that cheese microorganisms survive digestive stress, (ii) gain an initial picture of the impact of growth in a real cheese matrix on the microorganisms' survival ability, and (iii) validate the DIDGI as a more reliable tool than basic batch models. The growing interest in food microorganisms and their fate after ingestion prompts the question of how they might affect human health, since it is clear that a considerable proportion can survive passage through the gastrointestinal tract. These questions are being addressed in a gripping and challenging field of investigation at the intersection between microbiology, immunology and food science.

Acknowledgements

Part of the work was funded by the CNIEL (National Interprofessional Centre for Dairy Economy) and is part of the EcoDige project (2012-2015). I am very thankful to both CEPIA department of INRA and AgroParisTech for financing my work.

Supplementary data

Table S10: Microbial concentrations in model cheeses after a 28-day ripening period

Species	Microbial concentration (log CFU.g ⁻¹)
Bacteria	
<i>A. arilaitensis</i> Re117 ^T	6.17 ± 0.18
<i>B. aurantiacum</i> ATCC9174	6.55 ± 0.12
<i>C. casei</i> CC13b	9.00 ± 0.50
<i>H. alvei</i> 920	6.90 ± 0.25
<i>Lc. Lactis</i> S3	7.52 ± 0.12
<i>S. equorum</i> Mu206	6.80 ± 0.17
Yeasts	
<i>D. hansenii</i> CLIB 623	6.41 ± 0.25
<i>G. candidum</i> ATCC 204307	7.81 ± 0.23
<i>K. lactis</i> CLIB 683	6.90 ± 0.18

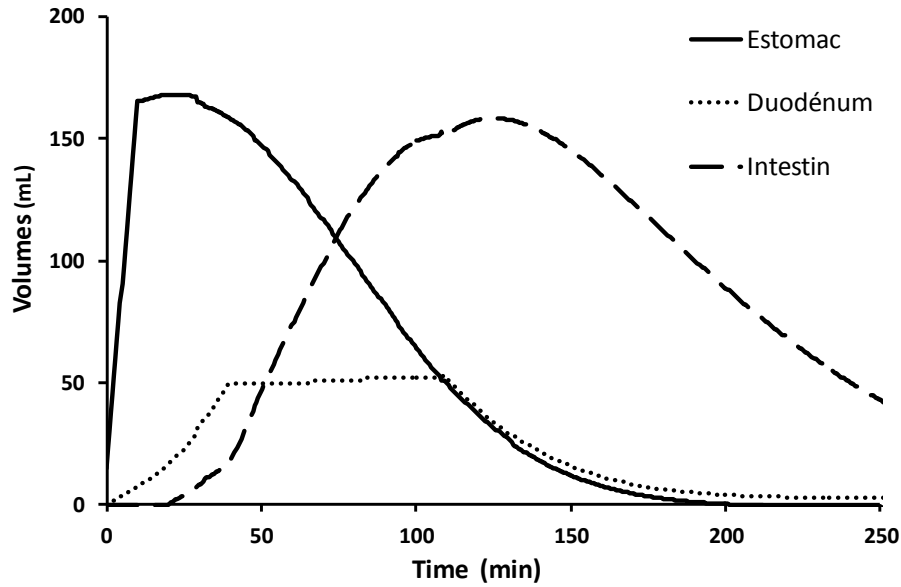


Figure S1: Filling/emptying curves for the DIDGI compartments during a 250-min experiment

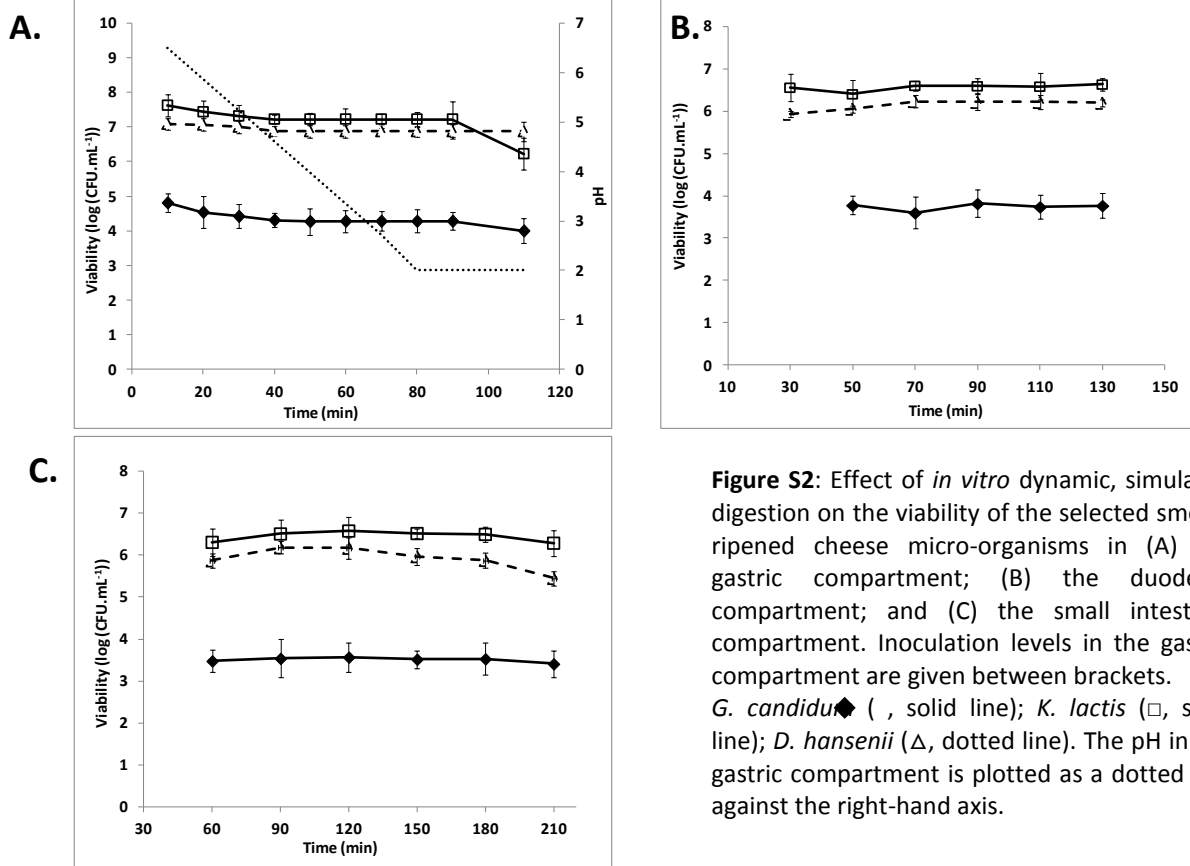
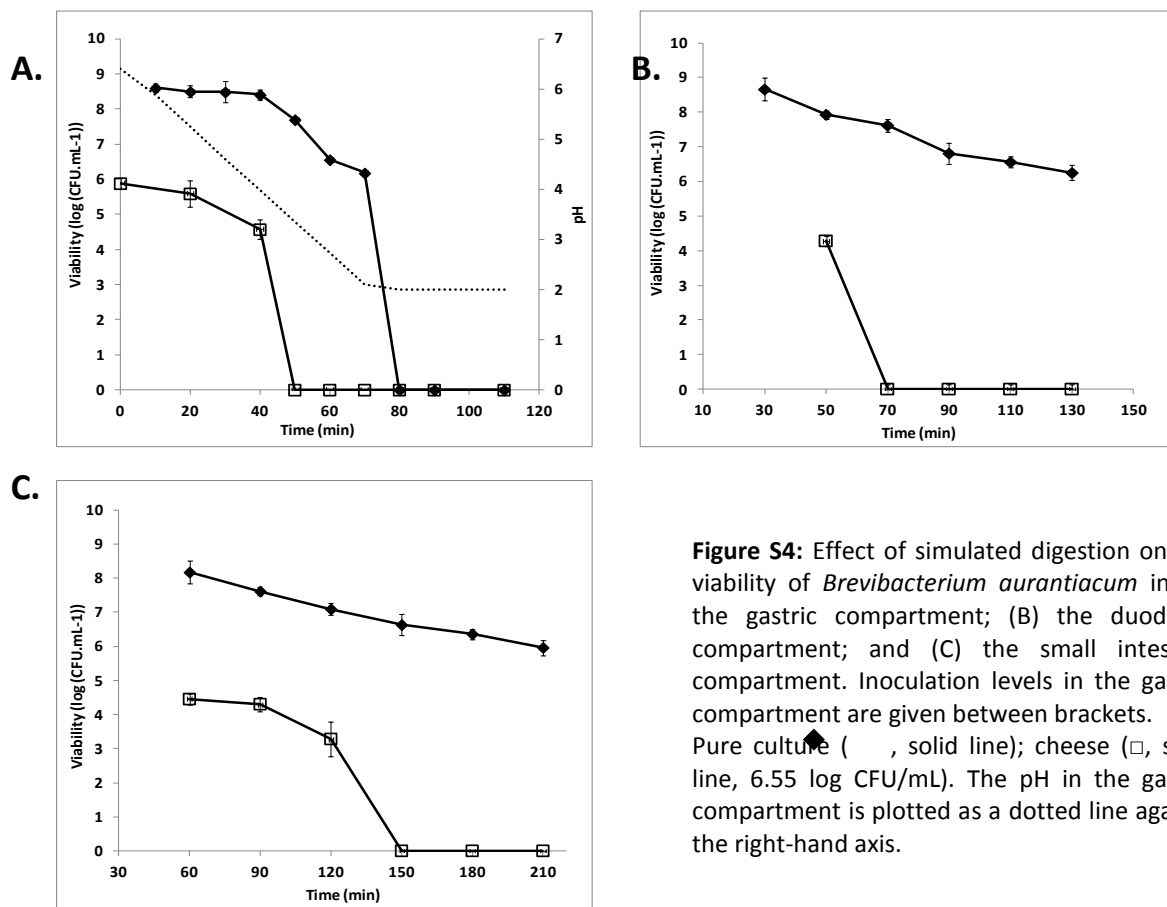
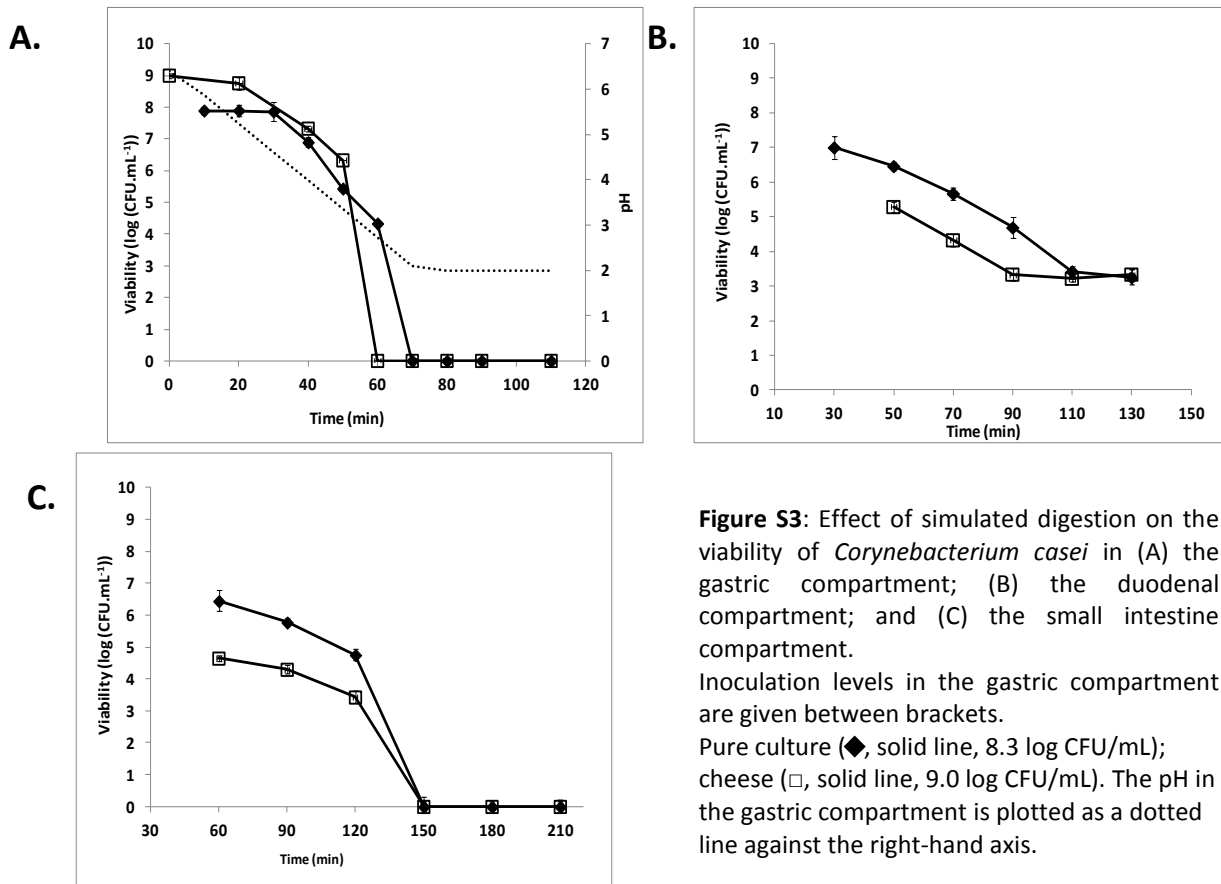


Figure S2: Effect of *in vitro* dynamic, simulated digestion on the viability of the selected smear-ripened cheese micro-organisms in (A) the gastric compartment; (B) the duodenal compartment; and (C) the small intestine. Inoculation levels in the gastric compartment are given between brackets. *G. candidus* (◆, solid line); *K. lactis* (□, solid line); *D. hansenii* (Δ, dotted line). The pH in the gastric compartment is plotted as a dotted line against the right-hand axis.



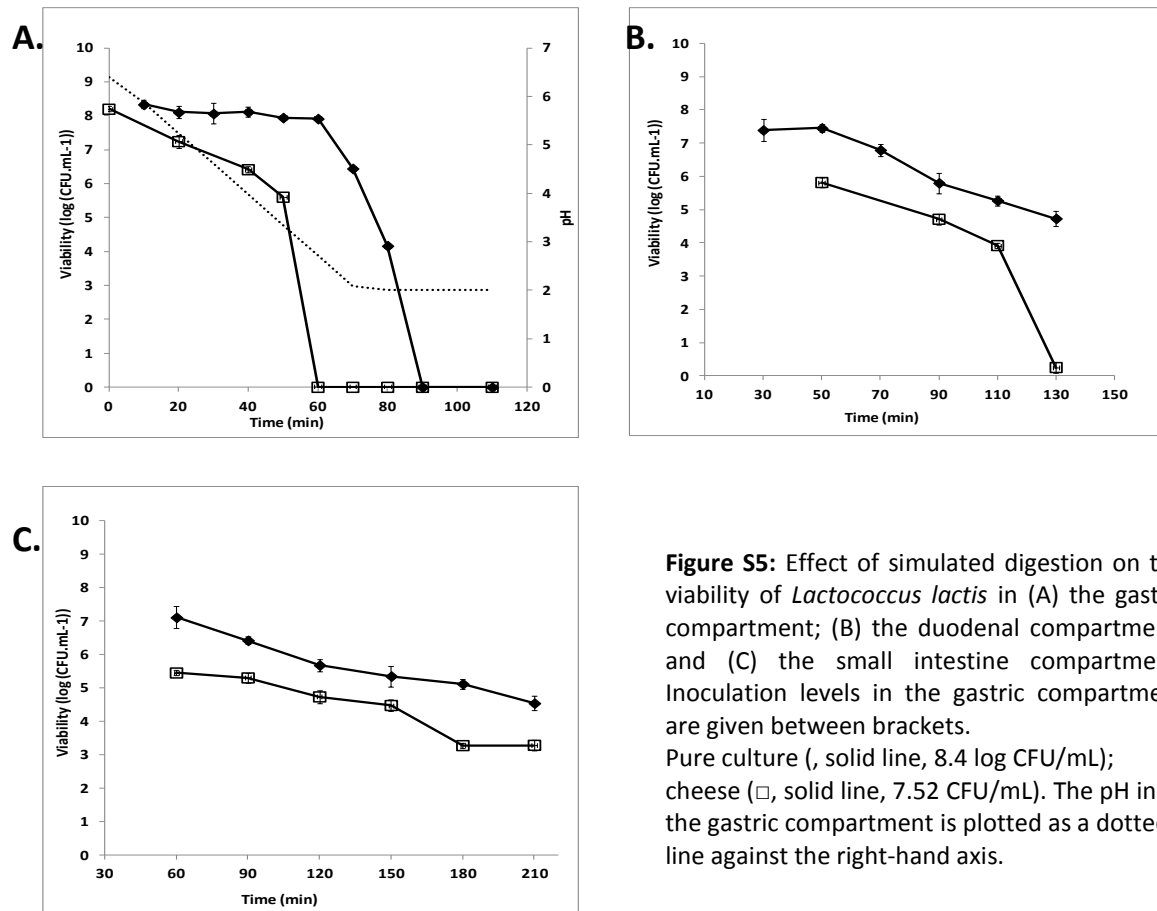


Figure S5: Effect of simulated digestion on the viability of *Lactococcus lactis* in (A) the gastric compartment; (B) the duodenal compartment; and (C) the small intestine compartment. Inoculation levels in the gastric compartment are given between brackets. Pure culture (, solid line, 8.4 log CFU/mL); cheese (□, solid line, 7.52 CFU/mL). The pH in the gastric compartment is plotted as a dotted line against the right-hand axis.

References

- Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L., & Cogan, T. M. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, 11(4): 259-274.
- Blanquet, S., Zeijdner, E., Beyssac, E., Meunier, J. P., Denis, S., Havenaar, R., & Alric, M. (2004). A dynamic artificial gastrointestinal system for studying the behavior of orally administered drug dosage forms under various physiological conditions. *Pharmaceutical research*, 21(4), 585-591.
- Bockelmann, W. (2002). "Development of defined surface starter cultures for the ripening of smear cheeses." *International Dairy Journal*, 12(2): 123-131.
- Bouzerzour, K., Morgan, F., Cuinet, I., Bonhomme, C., Jardin, J., Le Huërou-Luron, I., & Dupont, D. (2012). In vivo digestion of infant formula in piglets: protein digestion kinetics and release of bioactive peptides. *British Journal of Nutrition*, 108(12): 2105-2114.
- Brennan, N. M., Cogan, T. M., Loessner, M., & Scherer, S. (2004). Bacterial surface-ripened cheeses. *Cheese: chemistry, physics and microbiology*, 2: 199-225.
- Calbet, J. A., & Holst, J. J. (2004). Gastric emptying, gastric secretion and enterogastrone response after administration of milk proteins or their peptide hydrolysates in humans. *European journal of nutrition*, 43(3): 127-139.
- Chiang, C. C., Croom, J., Chuang, S. T., Chiou, P. W. S., & Yu, B. (2008). Development of a dynamic system simulating pig gastric digestion. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, (21): 1522-1528.
- Cousin, F. J., Mater, D. D., Foligne, B., & Jan, G. (2011). Dairy propionibacteria as human probiotics: a review of recent evidence. *Dairy science & technology*, 91(1): 1-26.
- David, L.A., Maurice, C.F., Carmody, R.N, Gootenberg D.B., et al., Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 2014, (505): 559-63.
- Elashoff, J. D., Reedy, T. J., & Meyer, J. H. (1982). Analysis of gastric emptying data. *Gastroenterology*, 83(6): 1306-1312.
- Gardiner, G., Ross, R. P., Collins, J. K., Fitzgerald, G., & Stanton, C. (1998). Development of a Probiotic Cheddar Cheese Containing Human-Derived *Lactobacillus paracasei* strains. *Applied and environmental microbiology*, 64(6): 2192-2199.
- Gardiner, G., Stanton, C., Lynch, P. B., Collins, J. K., Fitzgerald, G., & Ross, R. P. (1999). Evaluation of cheddar cheese as a food carrier for delivery of a probiotic strain to the gastrointestinal tract. *Journal of dairy science*, 82(7): 1379-1387.
- Guerra, A., Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Denis, S., Blanquet-Diot, S., & Alric, M. (2012). Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in biotechnology*, 30(11): 591-600.

- Guillemin, H., Perret, B., Picque, D., Ménard, O., & Cattenoz, T. (2010). Logiciel StoRM – Stomach and duodenum Regulation and Monitoring. IDDN.FR.001.230009.000.R.P.2010.000.31235, 290.
- Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2010). In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125(1): 1-12.
- Irlinger, F. and J. Mounier (2009). Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(2): 142-148.
- Janda, J. M., Abbott, S. L., Khashe, S., & Probert, W. (2002). Phenotypic and genotypic properties of the genus *Hafnia*. *Journal of medical microbiology*, 51(7): 575-622.
- Kim, W. S., Ren, J., & Dunn, N. W. (1999). Differentiation of *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* and subspecies *cremoris* strains by their adaptive response to stresses. *FEMS microbiology letters*, 171(1): 57-65.
- Kindstedt, P., Caric, M., & Milanovic, S. (2004). Pasta-filata cheeses. *Cheese: chemistry, physics and microbiology*, (2): 251-277.
- Kong, F., & Singh, R. P. (2008). Disintegration of solid foods in human stomach. *Journal of food science*, 73(5): R67-R80.
- Krulwich, T. A., Sachs, G., & Padan, E. (2011). Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis. *Nature Reviews Microbiology*, 9(5): 330-343.
- Kumura, H., Tanoue, Y., Tsukahara, M., Tanaka, T., & Shimazaki, K. (2004). Screening of dairy yeast strains for probiotic applications. *Journal of dairy science*, 87(12): 4050-4056.
- Lawrence, R. C., Gilles, J., & Creamer, L. K. (1993). Cheddar cheese and related dry-salted cheese varieties. In *Cheese: chemistry, physics and microbiology* (pp. 1-38). Springer US.
- Lay, C., Sutren, M., Lepercq, P., Juste, C., Rigottier-Gois, L., Lhoste, E., ... & Andrieux, C. (2004). Influence of Camembert consumption on the composition and metabolism of intestinal microbiota: a study in human microbiota-associated rats. *British Journal of Nutrition*, 92(03): 429-438.
- Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SC. (2010). Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nature Review Microbiology*, 8(3):171-84.
- Low, A. G. (1990). Nutritional regulation of gastric secretion, digestion and emptying. *Nutrition research reviews*, 3(01): 229-252.
- Ménard O, Cattenoz T, Guillemin H, Souchon I, Deglaire A, Dupont D, Picque D. (2013). Validation of a new in vitro dynamic system to simulate infant digestion. *Food Chemistry*, (145):1039-45
- Merritt, M. E., & Donaldson, J. R. (2009). Effect of bile salts on the DNA and membrane integrity of enteric bacteria. *Journal of medical microbiology*, 58(12): 1533-1541.
- Minekus, M. (1995). "A multi-compartmental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and small intestine." *Alternatives to Laboratory Animals (ATLA)*, (23): 197-209.

- Moughan, P. J., Leenaars, M., & Schuttetr, G. (1992). Endogenous amino acid flow in the stomach and small intestine of the young growing pig. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 60(4): 437-442.
- Mounier, J., Monnet, C., Vallaes, T., Arditi, R., Sarthou, A. S., Hélias, A., & Irlinger, F. (2008). Microbial interactions within a cheese microbial community. *Applied and environmental microbiology*, 74(1): 172-181.
- Mounier, J., Monnet, C., Jacques, N., Antoinette, A., & Irlinger, F. (2009). Assessment of the microbial diversity at the surface of Livarot cheese using culture-dependent and independent approaches. *International journal of food microbiology*, 133(1): 31-37.
- Pitino, I., Randazzo, C. L., Cross, K. L., Parker, M. L., Bisignano, C., Wickham, M. S., & Caggia, C. (2012). Survival of *Lactobacillus rhamnosus* strains inoculated in cheese matrix during simulated human digestion. *Food microbiology*, 31(1): 57-63.
- Plé, C., Adouard, N., Breton, J., Dewulf, J., Pot, B., Bonnarme, P., & Foligné, B. (2014) Designing specific cheese-ripening ecosystems to shape the immune effects of dairy products?, *Journal of Functional Foods* (2014), doi: 10.1016/j.jff.2014.11.021 (*in press*)
- Psomas, E., Andrighetto, C., Litopoulou-Tzanetaki, E., Lombardi, A., & Tzanetakis, N. (2001). Some probiotic properties of yeast isolates from infant faeces and Feta cheese. *International journal of food microbiology*, 69(1): 125-133.
- Ruiz, L., Margolles, A., & Sánchez, B. (2013). Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *Frontiers in microbiology*, (4).
- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., & Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of biotechnology*, 84(3): 197-215.
- Salque, M., Bogucki, P. I., Pyzel, J., Sobkowiak-Tabaka, I., Grygiel, R., Szmyt, M., & Evershed, R. P. (2012). Earliest evidence for cheese making in the sixth millennium BC in northern Europe. *Nature*.
- Saxelin, M., Lassig, A., Karjalainen, H., Tynkkynen, S., Surakka, A., Vapaatalo, H., ... & Hatakka, K. (2010). Persistence of probiotic strains in the gastrointestinal tract when administered as capsules, yoghurt, or cheese. *International journal of food microbiology*, 144(2): 293-300.
- Smith, M. E. and D. G. Morton (2010). *The Digestive System: Basic Science and Clinical Conditions*, Churchill Livingstone.
- Sumeri, I., Adamberg, S., Uusna, R., Sarand, I., & Paalme, T. (2012). Survival of cheese bacteria in a gastrointestinal tract simulator. *International Dairy Journal*, 25(1): 36-41.
- Turgeon, S. L., & Rioux, L. E. (2011). Food matrix impact on macronutrients nutritional properties. *Food Hydrocolloids*, 25(8): 1915-1924.
- Upreti, P., Bühlmann, P., & Metzger, L. E. (2006). Influence of calcium and phosphorus, lactose, and salt-to-moisture ratio on Cheddar cheese quality: pH buffering properties of cheese. *Journal of dairy science*, 89(3): 938-950.

3. Résultats marquants

Les levures *Geotrichum candidum*, *Kluyveromyces lactis* et *Debaryomyces hansenii* ont très bien résisté à l'ensemble des stress rencontrés dans le DIDGI (leurs viabilités respectives ne chutant que d'environ 1 log CFU.mL⁻¹ sur toute la durée des expérimentations). De plus, aucune différence n'a pu être mise en évidence entre les micro-organismes cultivés en condition de laboratoire ou cultivés en conditions fromagères réelles. Concernant les bactéries d'affinage, *Hafnia alvei* a moins bien supporté le stress gastrique lorsque cultivée en fromage que lorsque cultivée en milieu synthétique (absence de cellule viable après 90 minutes d'exposition pour le fromage contre 6 log CFU.mL⁻¹ en condition de laboratoire). *Corynebacterium casei* et *Staphylococcus equorum* ont montré la même capacité à résister aux stress digestifs quelles que soient les conditions de croissance. En revanche, *Brevibacterium aurantiacum* et *Arthrobacter arilaitensis* ont été plus sensibles à l'ensemble du passage dans le DIDGI lorsque cultivés en environnement fromager. *Lactococcus lactis* a montré une survie très médiocre lorsque cultivé en conditions fromagères et a mieux résisté aux stress digestifs *in vitro* lorsque cultivé en conditions de laboratoire. Les expérimentations *in vivo* (modèle murin au microbiote standardisé) ont corroboré les conclusions obtenues avec le DIDGI.

D'une manière générale, nous pouvons dire que la croissance en environnement fromager n'est pas sans effet sur la capacité des micro-organismes à survivre aux stress digestifs. De plus, concernant les expérimentations DIDGI, le pouvoir tampon du fromage a conduit à un ajout d'HCl beaucoup plus important que dans le cas de digestion de milieux de culture synthétique. En effet, afin de maintenir la même cinétique de pH dans l'estomac, l'ajout de HCl a dû être « forcé » et la quantité d'HCl ajoutée a excédé les valeurs observées *in vivo*. Notre choix a été de conserver les paramètres de digestion identiques quelle que soit la matrice digérée, afin de pouvoir comparer les différentes matrices entre-elles. Cependant, comme il l'a été expliqué dans la synthèse bibliographique, chez l'Homme, la structure et la composition de la matrice ont une influence sur la cinétique de la digestion. Ce point et ses implications seront abordés plus en détail dans les perspectives de cette thèse.

Cet article a confirmé l'utilité des dispositifs de digestion *in vitro* dynamiques comme outils préliminaires à des travaux *in vivo*. La survie d'une proportion importante des micro-organismes dans les deux cas a permis d'aborder la troisième partie des travaux concernant le potentiel immunomodulateur des deux fromages dans des modèles murins.

Chapitre 3 : Etude de l'effet immunomodulateur de deux fromages aux profils opposés dans deux modèles de colites murins

1. Présentation de l'article publié dans *Journal of Functional Foods*

L'objectif de cette partie du projet était d'évaluer l'impact de la consommation de deux fromages contenant des micro-organismes aux profils immunomodulateurs opposés, sur des modèles murins (i) sains, (ii) avec une colite induite au TNBS et (iii) avec une colite induite au DSS.

Bien qu'une quantité importante de micro-organismes soit ingérée lors de la consommation de fromage, l'influence de ces bactéries et levures d'affinage sur le consommateur n'a été que très peu étudiée. La majeure partie des travaux sur le sujet considère le fromage comme un bon candidat pour véhiculer des micro-organismes dont les caractéristiques probiotiques ont, par ailleurs, déjà été établies (Gardiner et al., 1999 ; Sharp et al., 2008 ; Lollo et al. 2012). Le fromage en tant que tel - et plus particulièrement les micro-organismes technologiques responsables de son affinage - n'a fait l'objet que d'un nombre très réduit de travaux. Ceux-ci concernent des technologies dont l'affinage n'implique presque qu'exclusivement des bactéries lactiques (Seong et al., 2012 ; Ricciardia et al. 2014) ; les derniers travaux en date font état d'une détection de ces micro-organismes vivants ainsi que d'une activité métabolique, dans la partie terminale du côlon (David et al., 2014,).

Au-delà de l'impact de la consommation de fromage sur des individus sains, ses conséquences ne sont que peu établies sur l'homéostasie intestinale de patients atteints de pathologie inflammatoire de l'intestin (ex. Inflammatory Bowel Disease (IBD) ou maladie de Crohn) et ne se concentrent pas sur les micro-organismes (Hosoya et al., 2012 ; Labonte et al., 2013).

Lors de nos précédents travaux, nous avons montré qu'une part non négligeable des micro-organismes d'affinage sélectionnés pouvait survivre à la digestion (articles 1 & 2) et que ces micro-organismes ne sont pas neutres d'un point de vue immunomodulateur. Un mélange de micro-organismes ne donnant pas toujours une réponse globale identique à la réponse des souches prises séparément (Chapman et al., 2011), les travaux développés dans cette partie du projet doivent permettre d'obtenir des pistes concernant les flores d'affinage fromagères lorsqu'elles se développent en conditions « réelles ».

Ici, nous avons utilisé la même technologie fromagère que lors des expérimentations réalisées pour l'article 2, en choisissant deux mélanges contenant les mêmes espèces de micro-organismes d'affinage (*Lactococcus lactis*, *Brevibacterium aurantiacum*, *Arthrobacter arilaitensis*, *Hafnia alvei*, *Staphylococcus equorum*, *Corynebacterium casei*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis* et *Geotrichum candidum*), dont certaines souches différaient par leur potentiel immunomodulateur – établi lors des expérimentations sur PBMCs de l'article 1.

Ceci a conduit à deux fromages dont les mélanges de souches avant affinage donnaient des réponses respectivement plutôt pro-inflammatoire (A) ou plutôt anti-inflammatoire (B). Les souris BALB/c ont été nourries avec des croquettes standards et gavées avec (i) un contrôle (PBS), (ii) un lait emprésuré, (iii) le fromage (A) et (iv) le fromage (B). Le gavage a permis de contrôler que la prise soit identique pour chacune des souris. La cohorte de 100 individus a été divisée en groupe « sain-contrôle » (n = 4 x 5), un groupe « colite induite TNBS » (n = 4 x 10) et un groupe « colite induite DSS » (n = 4 x 10). Ces modèles sont reconnus pour représenter une partie des symptômes retrouvés dans des pathologies du type IBD.

Afin de suivre la réponse immunomodulatrice provoquée par chaque matrice, le poids a été suivi quotidiennement pendant toute la durée de l'expérimentation. Les paramètres suivants ont été mesurés suite au sacrifice :

- Côlon : longueur et divers scores histologiques ; qPCR sur la portion distale (gènes marqueurs de l'inflammation) ; infiltration des macrophages.
- Rate : poids et aspect
- Sang : dosage de l'IL-6 et de la Serum Amyloid Protein (SAA)

L'article dans sa mise en page journal est disponible en Annexe III.

2. **Faits marquants**

- ✓ Des souches de micro-organismes isolées de fromages ont induit des réponses immunomodulatrices *in vitro* différentes.
- ✓ Des consortia de micro-organismes sélectionnés selon le critère précédent peuvent induire des réponses immunomodulatrice *in vitro* opposées.
- ✓ Certains cocktails de micro-organismes peuvent exacerber les colites induites chez des modèles murins.
- ✓ Le contrôle du design de fromage peut en partie prédire la nature de la réponse qu'ils engendreront *in vivo*.
- ✓ Le profil immunomodulateur du fromage peut s'avérer clé dans l'évaluation des risques de sa consommation chez des patients atteints d'IBD.

Designing specific cheese-ripening ecosystems to shape the immune effects of dairy products?

Coline Plé^{1,*}, Nadège Adouard^{2,*}, Jérôme Breton¹, Joëlle Dewulf¹, Bruno Pot¹, Pascal Bonnarne² and Benoit Foligné¹

* shared first authorship

¹ Institut Pasteur de Lille, Lactic Acid Bacteria & Mucosal Immunity, Center for Infection and Immunity of Lille, U1019, UMR 8204, Université de Lille, Rue du Pr Calmette, BP 245, F-59019 Lille, France

² INRA-AgroParisTech UMR 782 Microbiology and Food Process Engineering (GMPA), Avenue Lucien Brétignères F-78850 Thiverval-Grignon, France.

Correspondance: Benoit Foligné, Institut Pasteur de Lille, 1, Rue du Pr Calmette, BP 245, F-59019 Lille, France. Tel: +33 320 871 191; Fax: +33 320 871 192; Email: benoit.foligne@ibl.cnrs.fr

Running title: Cheeses and colitis in mice

Funding

The work was funded by the Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière (CNIEL) through by the Scientific Committee of Syndifrais/Cniel call for proposals, and is part of the EcoDige project (2012-2015 grant).

Abstract

Although large numbers of viable microorganisms are ingested through ripened-cheese consumption, little is known about the microbial ecosystems' influence on the host's immune responses. We designed experimental smear-ripened cheeses with bacteria and yeasts that have opposite immune effects (mixtures of selected *Lactococcus lactis*, *Brevibacterium aurantiacum*, *Arthrobacter arilaitensis*, *Hafnia alvei*, *Staphylococcus equorum*, *Corynebacterium casei*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis* and *Geotrichum candidum*) and evaluated their impact in the acute dextran sulphate sodium (DSS) and trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) colitis mouse models. BALB/c mice were fed with a control diet, a milk matrix or with lab-designed, 28-day-ripened prototype soft cheeses A and B (CheA and CheB) from cow milk that respectively hosted consortia of immuno-enhancing and immuno-modulatory microbial strains. Inflammatory markers and transcriptional signatures were evaluated in healthy mice and DSS- and TNBS-treated colitic mice. In the DSS colitis model, there were no differences between CheA and CheB in terms of the inflammatory read-outs. In contrast, CheA (but not CheB) exacerbated weight loss, systemic inflammation and colon lesions in the TNBS model. In the mouse, nutritional intervention with selected strains in cheeses may influence immunomodulation. Our results suggest that designer cheeses may provide opportunities for diet management.

Abbreviations: **CD**, Crohn's disease; **DSS**, dextran sulphate sodium; **IBD**, inflammatory bowel disease; **MPO**, myeloperoxidase; **PBMC**, peripheral blood mononuclear cell; **SAA**, serum amyloid A; **TNBS**, trinitrobenzene sulphonic acid; **TNF- α** , tumor necrosis factor alpha; **UC**, ulcerative colitis.

Keywords: Smear-cheese microflora, PBMC, immunomodulation, colitis, mouse model

1. Introduction

The role of dietary habits as an environmental risk factor (Ng et al., 2013; Gentschew, & Ferguson, 2012) or a factor able to prolong remission in inflammatory bowel disease (IBD) (Rajendran, & Kumar, 2010) has not received a great deal of research attention. Diet may influence gut inflammation through several biologically plausible mechanisms, including antigenic responses to food and alteration of the host microbiota (Clarke, & Mullin, 2008; Viladomiu, Hontecillas, Yuan, Lu, & Bassaganya-Riera, 2013). However, the association between diet and IBD has not been clearly demonstrated - mostly because the etiology of both Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) are not fully understood. The impacts of genetic factors, microbiome diversity and environmental factors have been well documented. Some risk factors and modulators, however, may vary in their influence; for example, smoking cessation improves CD but worsens UC (Cosnes, 2004; Birrenbach, & Bocker, 2004). Identification of the food types or components responsible for beneficial effects in IBD is tricky, since a range of doses and frequencies of macronutrients and micronutrients (including trace elements and pollutants) have to be considered. Although discriminating between causes and effects is challenging, there is a clear association between the incidence of IBD and loss of diversity within gut microbiota. This association fits with the hygiene hypothesis (Bach, 2002; Khosravi et al., 2014), in which the use of antibiotics and the increased consumption of refined food in our diet depletes the amount and activity of raw and fermented foods (Petrof, Claud, Gloor, & Allen-Vercoe, 2013). Thus, both nutritional food supplements and/or diets containing "healthy" food microbes are recommended.

Although it is widely acknowledged that the intake of so-called probiotic microorganisms is able to influence the host's immune responses (van Baarlen, Wells, & Kleerebezem, 2013; Marteau, et al., 2004; Foligné, Daniel, & Pot, 2013) epidemiological data on IBD and fermented foods (especially cheeses) are scarce. Some case-control studies have indicated that a high cheese intake is associated with CD (Maconi et al., 2010), whereas others have shown that patients with IBD eat cheese less frequently (Zvirbliene, Kiudelis, Zalinkevicius, & Kupcinskis, 2006). Meta-analyses of the impact of dairy products and cheese on diseases are inconsistent, since no particular cheese types or cheese-derived core microbial ecosystems have been clarified (Aune et al., 2012; Labonte, Couture, Richard, Desroches, & Lamarche, 2013). Although cheese-enriched diet was found to enhance anti-inflammatory and immune regulatory responses in normal mice and in a dextran sulfate sodium (DSS) colitis mouse model (Hosoya, Ogawa, Sakai, & Kadooka, 2012), the beneficial outcomes were not attributed to specific microorganisms (whether as live forms or inactivated). In addition to potentially bioactive peptides (Beermann, & Hartung, 2013; Korhonen, 2009) fatty acids and amines in milk, dominant cheese microbiota should also be considered, (Stanton, Ross, Fitzgerald, & Van

Sinderen, 2005). Indeed, foodborne bacteria and fungi from cheese are detectable in the human distal colon, where they have been shown to be metabolically active and capable of altering the resident microbiota (David et al., 2014). Moreover, many microbial-derived antigens, secreted compounds, surface molecules and cell-wall components (such as peptidoglycan, exopolysaccharides, teichoic acids, and mannans) have immunomodulatory properties (Lebeer, Vanderleyden, & De Keersmaecker, 2010). Whereas the type of immune-related response clearly depends on the intrinsic characteristics of each microbe from defined genera and species (*e.g.* Gram-positive or Gram-negative bacteria, yeasts and fungi), precise immune tuning will be strain-specific (as demonstrated *in vitro* for probiotic strains of lactic acid bacteria (LAB) such as lactobacilli (Nova et al., 2007, Foligne et al., 2007) and bifidobacteria (López, Gueimonde, Margolles, & Suárez, 2010; Riedel et al., 2006; Hoarau et al., 2008) and yeasts (Foligné, Dewulf, Vandekerckove, Pignède, & Pot, 2010; Romanin et al., 2010; Maccaferri, Klinder, Brigidi, Cavina, & Costabile, 2012). Previous research has demonstrated the major role of bacterially induced IL-10 *in vitro* and the associated potential for relieving experimental colitis *in vivo* (Foligne et al., 2007; López, Gueimonde, Margolles, & Suárez 2010; Riedel et al., 2006; Hoarau, et al., 2008; Foligné, Dewulf, Vandekerckove, Pignède, & Pot, 2010; Romanin et al., 2010; Maccaferri, Klinder, Brigidi, Cavina, & Costabile, 2012; Peran et al., 2005). However, attempts to characterize the immune patterns induced by strains from cheese-ripening ecosystems are rare (Rahman et al., 2013) and have been restricted to non-starter LAB.

We have previously studied the diverse immunomodulatory properties of various microbial strains used in the preparation of dairy products (Adouard, unpublished data). By considering neutral, immuno-enhancing and immune-regulatory bacteria and yeasts, we defined distinct starter mixtures with opposite properties and used them to produce experimental cheeses likely to have opposite immune effects. Given that the health effects of probiotics are strain-specific, we postulated that multiple-strain preparations would be more effective than single-strain preparations (Timmerman, Koning, Mulder, Rombouts, & Beynen, 2004). In the context of gut inflammation, multiple-strain preparations have never been assessed in pre-clinical or clinical trials. There is increasing evidence to suggest that murine colitis may be prevented by administering several mixtures (Rachmilewitz et al., 2004; Roselli et al., 2009; Drouault-Holowacz et al., 2006; Hart et al., 2004; Gionchetti et al., 2012), although the efficacy varies with the composition of the mixture (Roselli et al., 2009). Similarly, the immune and health properties of multiple-strain and multiple-species probiotic mixes in a cheese ecosystem cannot be deduced from their respective components (Timmerman et al., 2007; Chapman, Gibson, & Rowland, 2011). Thus, we decided to screen various mixtures for their immuno-regulatory potential, with the objective of selecting optimal strains as tools for further cheese-making experiments (*i.e.* custom ripened dairy products with either neutral, anti- or pro-inflammatory-like dominant ecosystems). Indeed, prototype cheeses may be useful in

evaluating the effects of immune intervention in preclinical models of immune-dysregulated diseases (such as colitis).

This type of tool would be of great interest for better dietary management in immune-related disorders and could open up new perspectives in cheese-making. For example, a custom-designed cheese could form part of an appropriate diet in a specific at-risk population or patient population.

The objective of the present study was thus to evaluate the potential impact of fermented dairy products (based on the immune determinants of their microbial components), rather than to design a "probiotic cheese" *per se*.

2. Material and Methods

2.1. Microorganisms, growth conditions and mixtures

In the present study, 14 strains (10 bacteria, 3 yeasts and 1 fungus isolated from a dairy environment) were considered. Furthermore, five reference strains (*Bifidobacterium longum* Bb536, *Escherichia coli* TG1, *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Lactobacillus salivarius* Ls33 and *Lactococcus lactis* MG1363, Table S1) were used for immune cell stimulation, as previously described (Foligné et al., 2010). All strains used in this study were identified by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (Microflex Technology, Bruker Daltonics, Fremont, CA, USA), as previously described (Blondiaux, Gaillot, & Courcol, 2010). All growth media were purchased from Difco (Pessac, France). With the exception of *Hafnia alvei* (grown in Luria Bertani medium), bacterial cheese isolates were grown in 100 mL of brain heart infusion broth in 500 mL Erlenmeyer flasks at 25°C and were placed on a shaking table (200 rpm). *Lactococcus lactis* was cultivated in M17 medium supplemented with 0.5% glucose in 100 mL Schott bottles at 30°C. Lactobacilli were grown at 37°C with limited aeration in de Man, Rogosa, Sharpe (MRS) broth in 100 mL Schott flasks while *E. coli* was grown at 37°C in LB medium and *B. longum* was grown anaerobically in MRS broth supplemented with 0.05% L-cysteine-hydrochloride (Sigma, St Quentin Fallavier, France). Yeasts and fungi were grown in 100 mL of potato dextrose broth in 500 mL Erlenmeyer flask, at 25°C and shaken at 200 rpm. All strains were grown until the late stationary phase (as measured in preliminary growth experiments; data not shown). The reference strain preparations were prepared as follows: stationary-phase microbes were washed twice in PBS and resuspended in PBS containing 20% glycerol to adjust the cell density to McFarland 3 using a portable photometer (Densimat, bioMérieux, Craonne, France) (Araujo, Rodrigues, & Pina-Vaz, 2004).

In order to mimic complex multiple-strain cheese ecosystems as closely as possible, six distinct mixtures of ten or so bacteria and yeasts were prepared (Table 1). Each of the mixtures had a bacteria/yeast ratio of 1. Hence, the component volumes (in a total volume of 200 µL) were as follows: *Lactococcus lactis* 25 µL, *Brevibacterium aurantiacum* 15 µL, *Arthrobacter arilaitensis* 15 µL, *Hafnia alvei* 15 µL, *Staphylococcus equorum* 15 µL, *Corynebacterium casei* 15 µL, *Debaryomyces hansenii* 33 µL, *Kluyveromyces lactis* 33 µL, *Geotrichum candidum* 33 µL.

Table 1. Composition of the various mixtures of microbial strains used in the present study. *The most IL-10-inducer strains (so-called-anti-inflammatory) are specified in bold while those which are more associated with a pro-inflammatory response are indicated as underlined.*

Strains	Mix 1	Mix 2	Mix 3	Mix 4	Mix 5	Mix6
<i>Lc. lactis</i>	S3	S3	S3	S3	S3	S3
<i>B. aurantiacum</i>	ATCC 9174	ATCC 9174	ATCC 9174	ATCC 9174	ATCC 9174	ATCC 9174
<i>A. arilaitensis</i>	Re 117 ^T	Re 117 ^T	Re 117 ^T	Re 117 ^T	Re 117 ^T	Re 117 ^T
<i>H. alvei</i>	GB01	<u>Type 2 n°920</u>	GB01	---	GB01	GB01
<i>S. equorum</i>	1265/GM16	<u>Mu206</u>	1265/GM16	1265/GM16	1265/GM16	1265/GM16
<i>C. casei</i>	DPC S298^T	<u>1-3b</u>	DPC S298^T	DPC S298^T	DPC S298^T	DPC S298^T
<i>D. hansenii</i>	CLIB 623	CLIB 623	CLIB 623	CLIB 623	CLIB 623	CLIB 623
<i>K. lactis</i>	CLIB 683	CLIB 683	CLIB 683	CLIB 683	CLIB 683	CLIB 683
<i>G. candidum</i>	UCMA 103	<u>ATCC 204307</u>	---	UCMA 103	UCMA 103	<u>ATCC 204307</u>
<i>P. camemberti</i>	---	---	---	---	<u>FM 13</u>	---

2.2. Chemicals

Chemicals and reagents were purchased from Sigma-Aldrich Chemical, St Quentin Fallavier, France, unless otherwise stated.

2.3. Peripheral mononuclear blood cell (PBMC) assay

Peripheral mononuclear blood cells ($2 \times 10^6/\text{ml}$) isolated from three healthy donors were seeded in RPMI 1640 medium (Life Technologies, Paisley, United Kingdom) in 24-well tissue culture plates (Corning, New York, NY, USA), as previously described (Foligne et al., 2007). Ten microliters of thawed suspensions of the mixtures or individual reference strains to be tested were added. After 24 h of stimulation, culture supernatants were collected and assayed for cytokine levels using ELISAs for human IL-10, IFN γ and IL-12p70 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and human IL-6 and TNF α (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), according to the manufacturer's recommendations. Data were first generated in pg.L^{-1} for each donor and then expressed as the mean for all three donors as a percentage of the value measured with a reference strain (*i.e.* *B. longum* Bb536 for IL-10 and *Lc. lactis* MG1363 for IL-12, TNF α and IFN γ). This normalization against internal standard strains has been validated as an accurate and reproducible way of comparing large numbers of strains (Foligne et al., 2007).

2.4. Experimental/prototype cheeses and the feeding procedure

Pilot-scale Livarot-type cheese was produced (via coagulation, cutting, draining, and molding of the curd) under aseptic conditions in a 14 liter tank. The pasteurized milk used (12 liters) was standardized at a fat concentration of 29 g/l fat by mixing semi-skimmed and full-fat milk (Alsace Lait, Hœrdt, France). Ten milliliters of a filter-sterilized 100 g.L⁻¹ CaCl₂ solution was added to the milk and the mix was pre-heated at 34°C prior adding *Lc. Lactis* to obtain a final concentration of 10⁶ cfu/ml. After the pH of the milk had reached 6.3, a mix of the appropriate selected ripening bacteria and yeast strains was added at concentrations of each microorganism at 10⁶ and 10⁴ cfu/ml, respectively, for both Cheese A (CheA) and Cheese B (CheB). Filter-sterilized rennet (Naturen, Chr. Hansen, Arpajon, France) containing 520 mg/l of active chymosin was then added (0.3 ml/l of milk). The coagulation time was 20 min, and the curd was cut after 30 min of hardening. The curd was then stirred for 5 min at a rate of 10 stirs.min⁻¹. After the curd had stood for 15 min, 6.5 liters of whey were removed. Two cheeses were shaped in circular polyurethane molds (200 x 150 x 40 mm) and weighed approximately 900 g each. The molds were then stored at 20°C and inverted four times (30 min, 2.5 h, 6 h, and 22 h after the molding step). After 24 h, the cheeses were removed from the mold. After another two hours, the cheeses were cut into smaller pieces (diameter: 50 mm; thickness: 15 mm; weight: 20 g). These were placed in a sterile environment at 14 °C with a relative humidity of 97% for a 28-day ripening period. In order to compare the cheeses with an analogous matrix (MTX), solidified milk was prepared daily and treated with the filter-sterilized rennet and the CaCl₂.

For both the DSS and trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) colitis experiments, groups of 10 mice were given either 1 ml of phosphate buffer (the control group), 1 g of the dairy matrix (the MTX group) or 1 g of the corresponding cheeses (the CheA and CheB groups) via the intragastric route. Treatments were given daily (in the late afternoon) for five and ten consecutive days for the TNBS and DSS experiments, respectively.

2.5. Experimental colitis

Animal care and ethical aspects

Ninety female BALB/c mice (aged 7 weeks on arrival) were obtained from Charles River (Saint-Germain-sur-l'Arbresle, France). The animals were randomly divided into groups of five or ten and housed in a controlled environment (with a temperature of 22°C, a 12 h/12 h light/dark cycle and *ad libitum* access to food and water). All animal experiments were performed according to the guidelines of the *Institut Pasteur de Lille* Animal Care and Use Committee and in compliance with the Amsterdam Protocol on Animal Protection and Welfare and the Directive 86/609/EEC on the Protection of Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (updated in the Council of Europe's Appendix A). The animal work was also compliant with current French legislation (the French Act 87–848, dated 19-10-1987) and the European Communities Amendment of Cruelty to Animals Act 1976. The study's objectives and procedures were approved by the Nord-Pas-de-Calais region's Ethics and Welfare Committee for Animal Experiments (Lille, France; authorization numbers: 19/2009R and 21/2009R).

DSS-induced colitis and the assessment of inflammation

Acute colitis was induced in BALB/c mice on day 7 by the administration of DSS (molecular weight 36000-50000 Da, MP Biomedicals, Illkirch, France) dissolved at a concentration of 5% v/v in the animals' drinking water for 7 consecutive days (Foligne et al., 2007b). Groups of 10 mice were used, and a healthy control group (*i.e.* not exposed to DSS) was given tap water. Animals were weighed daily. After the mice had been sacrificed, colon lengths and weights were scored before tissue processing for microscopic analysis. Briefly, cross-sectional rings of the mid-colon were fixed in 4% formaldehyde, dehydrated and embedded in paraffin. Sections (thickness: 5 µm) were stained with May-Grünwald-Giemsa reagent and scored as described by Hartmann et al. (Hartmann et al., 2000).

TNBS-induced colitis and inflammation scoring

Acute colitis was triggered on day 5 by the intra-rectal administration of 50 µl to reach 100 mg/kg bodyweight TNBS (Sigma-Aldrich Chemical) in 0.9% NaCl/ethanol (50/50 v/v) (Drouault-Holowacz et al., 2006). The animals were monitored daily for bodyweight loss. Three days after the induction of colitis, mice were sacrificed and blood samples were collected immediately. The serum was separated and frozen (-20°C). After dissection, two independent observers blindly scored the macroscopic inflammation of the colon on the Wallace scale (Wallace, MacNaughton, Morris, & Beck, 1989). Two-centimeter-long fragments of the distal colon were collected and frozen at -80°C.

Samples for histologic analysis were processed for paraffin-embedded in 5-µm sections and stained with May Grünwald-Giemsa reagent, as described above.

Following examination under the microscope, tissue lesions were scored according to the Ameho criteria (Ameho et al., 1997). Lastly, the degree of polymorphonuclear neutrophil infiltration in the distal colon was assessed by quantifying myeloperoxidase (MPO) activity, as described previously (Bradley, Priebat, Christensen, & Rothstein, 1982).

Cytokine and serum amyloid protein A (SAA) assays

Murine IL-6 and SAA levels were measured using commercial ELISA kits from BD Pharmingen (San Diego, CA, USA) and Biosource International (Camarillo, CA, USA), respectively, with a lower limit of detection of 15 pg/ml for IL-6 and 30 ng/ml for SAA.

Real-time quantitative PCR and gene expression analysis

Murine intestinal tissue (0.5 cm lengths of the colon) was processed with RNA stabilization solution (RNA-later, Ambion, Life Technologies) and stored at -80°C. After homogenization of samples using the FastPrep instrument (MP Biomedicals, Illkirch-Graffenstaden, France), total RNA was isolated using RNA spin columns (Macherey-Nagel, Hoerd, France). Reverse transcription and real-time PCR were performed with reaction kits (the High-Capacity cDNA RT Kit) and reagents (Universal PCR Master Mix) from Applied Biosystems (Courtaboeuf, France), according to the manufacturer's instructions and published procedures. The PCR reactions were performed with a MX3005P Stratagene machine (Agilent Technologies, Massy, France). For the *Tnfa*, *Il1-b*, *Nos2*, *Cox-2*, *Gpx2*, and *IL6* target genes, a custom gene expression assay (TaqMan, Applied Biosystems) was used with commercially designed and validated primers (Table S2). The housekeeping gene beta-actin was run as an internal control. The recorded data were analyzed using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ calculating method and expressed as a fold-increase over the control group's values.

2.6. Statistical analysis

Results are expressed as the mean $\pm$ standard error of the mean. Statistical analysis was performed with a two-tailed Student's t-test or a non-parametric one-way analysis of variance (the Mann Whitney U-test) when appropriate. The threshold for statistical significant was set to $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Immunomodulatory profiles of microorganism ecosystems

The immunomodulatory effects of the fourteen strains used in the present work had been previously investigated in a larger study of the diversity of cheese-ripening microorganisms as pure cultures (Adouard, unpublished data). Thus, the release of cytokines by human PBMCs from healthy donors allowed us to determine whether these strains exhibit an anti-inflammatory (*i.e.* high IL-10 inducers and low release of IFN γ and IL-12) or pro-inflammatory (*i.e.* low IL-10 inducers and higher inducers of IFN γ and IL-12) based on *in vitro* profile (relative to the reference strains) In this context, some strains appear to induce responses with intermediary levels of cytokines, then characterized to be more or less neutral, as shown in Table 1. Based on the strain ranking, six different mixtures of strains were reconstituted in order to mimic the bacterial and yeast diversity encountered in prototype ripened-cheese ecosystems (Mounier et al., 2005). We selected no more than 10 microorganisms per mixture and maintained the 1:1 ratio of bacteria to yeast. Using a core set of common strains used in cheese-ripening (including *Lc. lactis*, *B. auranticum*, *A. arilaitensis*, *D. hansenii* and *K. lactis*), Mix 1 was completed with four anti-inflammatory strains of *H. alvei*, *S. equorum*, *C. casei* and *G. candidum*. In theory, Mix 1 was the most anti-inflammatory blend. In contrast, Mix 2 was supplemented with four strains showing a pro-inflammatory profile, making it (in theory) the least anti-inflammatory mixture. To estimate the role/importance of an individual strain, four other mixtures were designed by removing, adding or substituting a single species. When compared with Mix 1, Mix 3 lacked an anti-inflammatory strain of *Geotrichum* spp, whereas a pro-inflammatory *G. candidum* was added to the Mix 6. Lastly, Mix 4 lacked an anti-inflammatory strain of *Hafnia* and Mix 5 comprised a strain of *Penicilium camemberti* (Table 2).

Table 2: Final microbial counts reached in the two experimental cheeses

Microorganisms	Microbial concentration at 28 days of ripening (log CFU.g ⁻¹)	
	Cheese A (Mix2)	Cheese B (Mix1)
Bacteria		
<i>Lc. Lactis</i> S3	7.52 ± 0.12	6.25 ± 0.44
<i>B. aurantiacum</i> ATCC9174	6.55 ± 0.12	6.07 ± 0.61
<i>C. casei</i> 1-3b	9.00 ± 0.50	-
DPC S298T	-	8.37 ± 0.32
<i>H. alvei</i> GB01	-	6.90 ± 0.25
Type 2 n°920	7.09 ± 0.18	
<i>A. arilaitensis</i> Re117 ^T	6.17 ± 0.18	5.55 ± 0.15
<i>S. equorum</i> 1265	-	6.32 ± 0.12
Mu206	6.80 ± 0.17	-
Yeasts		
<i>D. hansenii</i> CLIB 623	6.41 ± 0.25	6.85 ± 0.29
<i>G. candidum</i> UCMA 103	-	7.81 ± 0.23
ATCC 204307	6.80 ± 0.26	-
<i>K. lactis</i> CLIB 683	6.90 ± 0.18	7.08 ± 0.15

The six mixtures' ability to induce PBMCs to release cytokines into the supernatant was compared with the most strongly inducing reference strain, i.e. *B. longum* Bb536 for IL-6 and IL-10 and *Lc. lactis* MG1363 for the pro-inflammatory mediators IL-12, TNFα and IFNγ. All mixes were weak inducers of IL-12 and IFNγ and moderate inducers of TNFα; this is the profile typically observed for mixtures of eukaryotic organisms (Fig. 1A-D). Although just half the biomass was composed of yeasts, the low observed stimulatory ability suggests that yeasts were preponderant in the overall immune response. It may thus be of value to add eukaryotic strains to bacterial mixes that induce pro-inflammatory mediators (IL12, TNFα and IFNγ. In contrast, the presence of yeasts did not influence the bacteria's propensity to induce substantial amounts of IL-6 and IL-10.

Figure 1

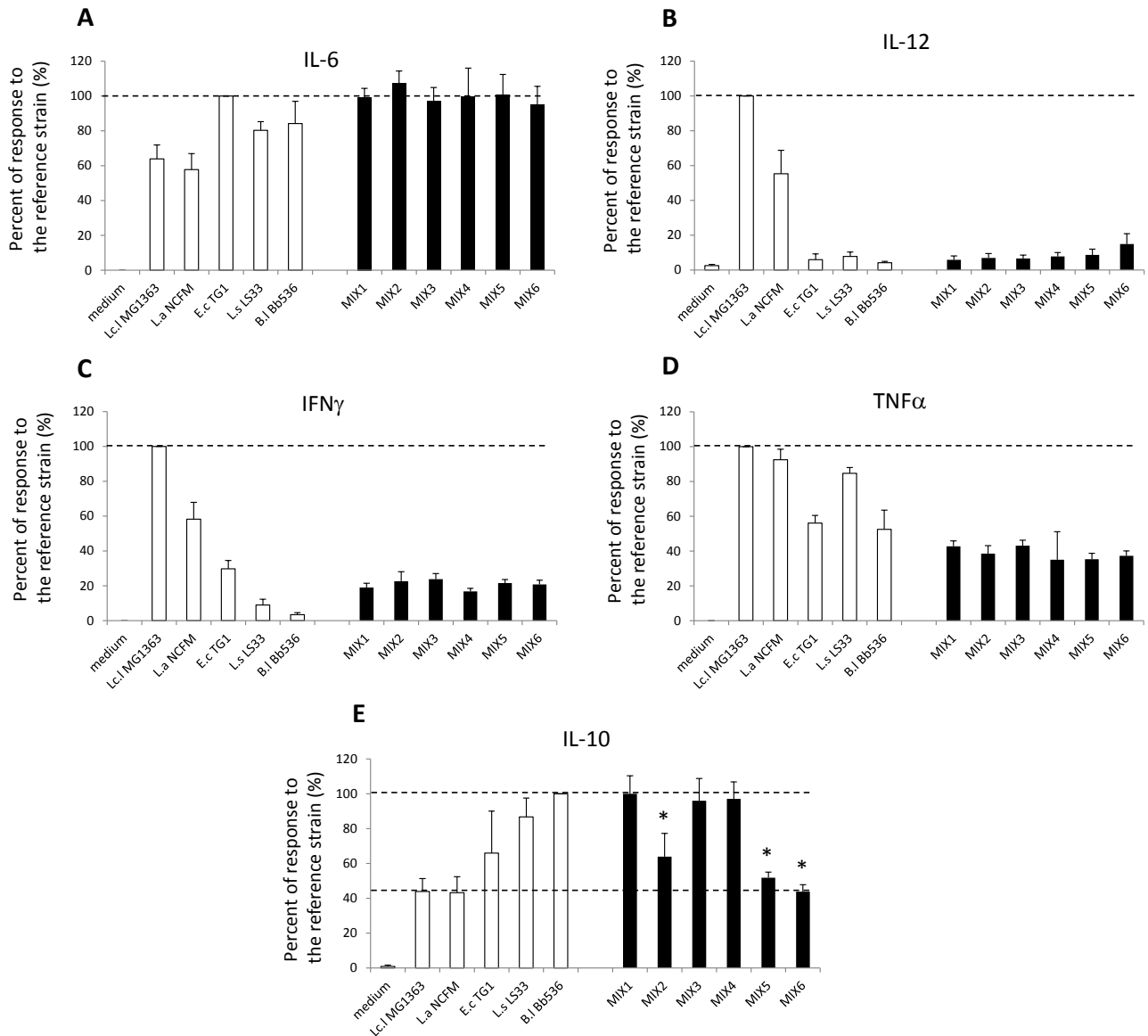


Figure. 1. Production of various cytokines in the supernatants of cultured human PBMCs (three donors) after 24 h of stimulation with an equivalent mass of reference strains (white bars) or six distinct, reconstituted mixtures of ripened cheese microorganisms. (A) IL-6, (B) IL-12, (C) IFN γ , (D) TNF α and (E) IL-10. Data are expressed as the mean $\pm$ SEM response as a percentage of a high-inducer reference strains (*B. longum* for IL-10 and *Lc. Lactis* for the other mediators).

The six distinct mixtures stimulated similar amounts of IL-6, IL-12, TNF α and IFN γ suggesting that the PBMCs sensed the various consortia of microorganisms in much the same way (Fig. 1A-D). However, the mixtures differed significantly in terms of secretion of IL-10 (Fig. 1E). It is noteworthy that Mix 1 induced anti-inflammatory factors to the same extent as the *B. longum* reference strain, whereas (as expected) Mix 2 was significantly less able to induce IL-10 ($p < 0.05$). Compared with Mix 1, the absence of the anti-inflammatory strains *Geotrichum candidum* UCMA 103 or *Hafnia alvei* GB01 (in Mix 3 and Mix 4, respectively) did not modify the net anti-inflammatory balance. In contrast, replacing *G. candidum* UCMA 103 by the neutral strain *G. candidum* ATCC 204307 (in Mix 6) was enough to reverse the mixture's anti-inflammatory characteristics by nearly 50% ($p < 0.05$). Hence, Mix 6 had a low IL-10-stimulating capacity (close to that of the *Lc. lactis* and *Lb. acidophilus* reference strains). Lastly, addition of the fungus *Penicillium camemberti* (Mix 5) to the anti-inflammatory consortium was also associated with a 50% reduction ($p < 0.05$) in the *in vitro* anti-inflammatory potential.

3.2. The impact of two distinct, designed, ripened cheeses on healthy mice

In view of the different *in vitro* immune potentials of Mix 1 and Mix 2, we decided to inoculate milk with these cocktails in order to produce cheese-like dairy products. The two “tailored” prototype cheeses were prepared simultaneously. After four weeks of ripening, the two cheeses had similar final counts for all microorganisms (Table 2).

CheA and CheB (based on fermentation with a poorly anti-inflammatory Mix 2 and the anti-inflammatory Mix 1) were evaluated (along with MTX) in healthy mice. Feeding healthy mice for 8 days with the different diets did not induce any significant changes in body weight or in colonic transcription levels of the tested genes (*i.e.* *Tnf*, *Il1b*, *Il6*, *Il10*, *Ifng*, *Zo1*, *Nos2*, *Ptgs2* and *Hmox1*, with fold-increases or –decrease of no more than 1.5 vs. controls). Only a small (2-fold) increase in expression of *Pparg* was measured in the CheB group (data not shown). Blood levels of SAA and IL-6 were undetectable, suggesting that all treatments with dairy products were safe and well-tolerated under basal, non-inflamed conditions.

3.3. The impact of two distinct, designed, ripened cheeses in two murine models of experimental colitis

As expected, seven days of DSS administration induced severe colitis in mice, with an average bodyweight loss of 15%, significant colon shortening, and elevated macroscopic and histological scores (Fig. 2A-C and data not shown), relative to healthy control mice. Although MTX was associated with a slightly lower weight loss, the MTX, CheA and CheB diets were not associated with any significant protective effects in terms of the inflammatory parameters investigated (data not shown). CheA and CheB were associated with non-significant trends toward the intensification of certain factors (such as macroscopic injury; Fig. 2B, 2C and 2D). There were no significant differences between CheA and CheB.

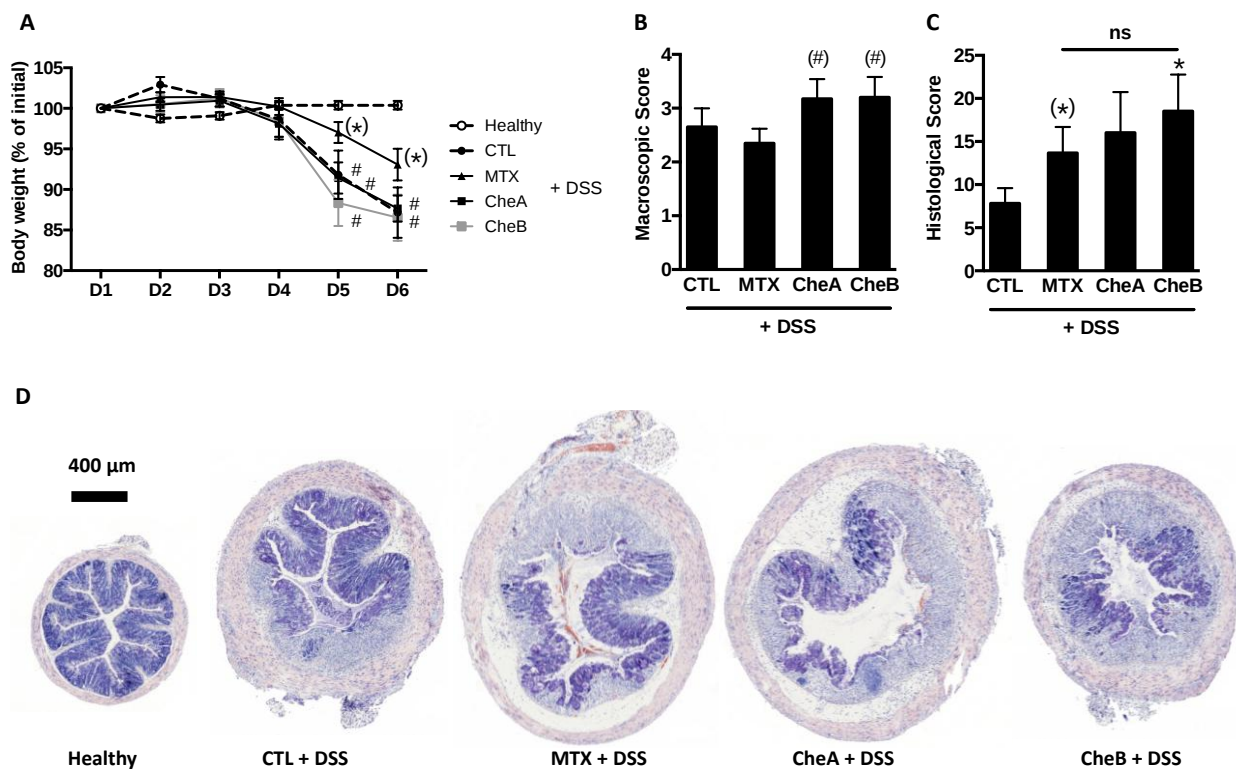


Figure 2. Impact of dietary cheeses on seven-day DSS colitis in mice. (A) Body weight loss (as a percentage of the initial weight) in the healthy, PBS control (CTL), milk matrix (MTX), cheese A (CheA) and cheese B (CheB) groups. (B) Macroscopic scores. (C) Microscopic scores. The data represent the mean ($\pm$ SD) of 10 mice per group. * $p < 0.05$ vs. the control group; (*) $0.05 < p < 0.1$ vs. the control group; # $p < 0.05$ vs. the MTX group; (#) $0.05 < p < 0.1$ vs. the MTX group). (D) Representative histologic preparations of the colon (May-Grünwald-Giemsa staining) from mice from the various groups. Scale bars: 400 μ m.

In the TNBS colitis model, the symptoms in the control, MTX and CheB groups were quite similar, with body weight loss of up to 15% and similar macroscopic and histological scores (Fig. 3A-C) Transcriptional analysis of the inflammatory marker genes *Cox2*, *Nos2*, *Il6*, *Hmox1*, *Tnf* and *Il1b*, and the measurement of MPO levels and blood SAA levels showed that the degree of induction was similar for all three conditions (Fig. 3D-F). These findings suggest that CheB (the cheese containing the most anti-inflammatory bacterial and yeast strains) had no specific effect on the symptoms of colitis. In contrast, mice fed for five consecutive days with CheA (the cheese containing an overall more neutral/less anti-inflammatory consortium of strains) showed exacerbated signs of colitis. This was evidenced by a significant ($p < 0.05$) increase in weight loss (by up to 20%), a significantly higher disease score, greater colonic MPO activity, greater expression of inflammatory genes (Fig. 3D-F) and more pronounced pathological features (Fig. 3G). Hence, the rate of progression of colitis and the intensity of inflammation were significantly higher in the CheA group than in CheB group ($p < 0.05$).

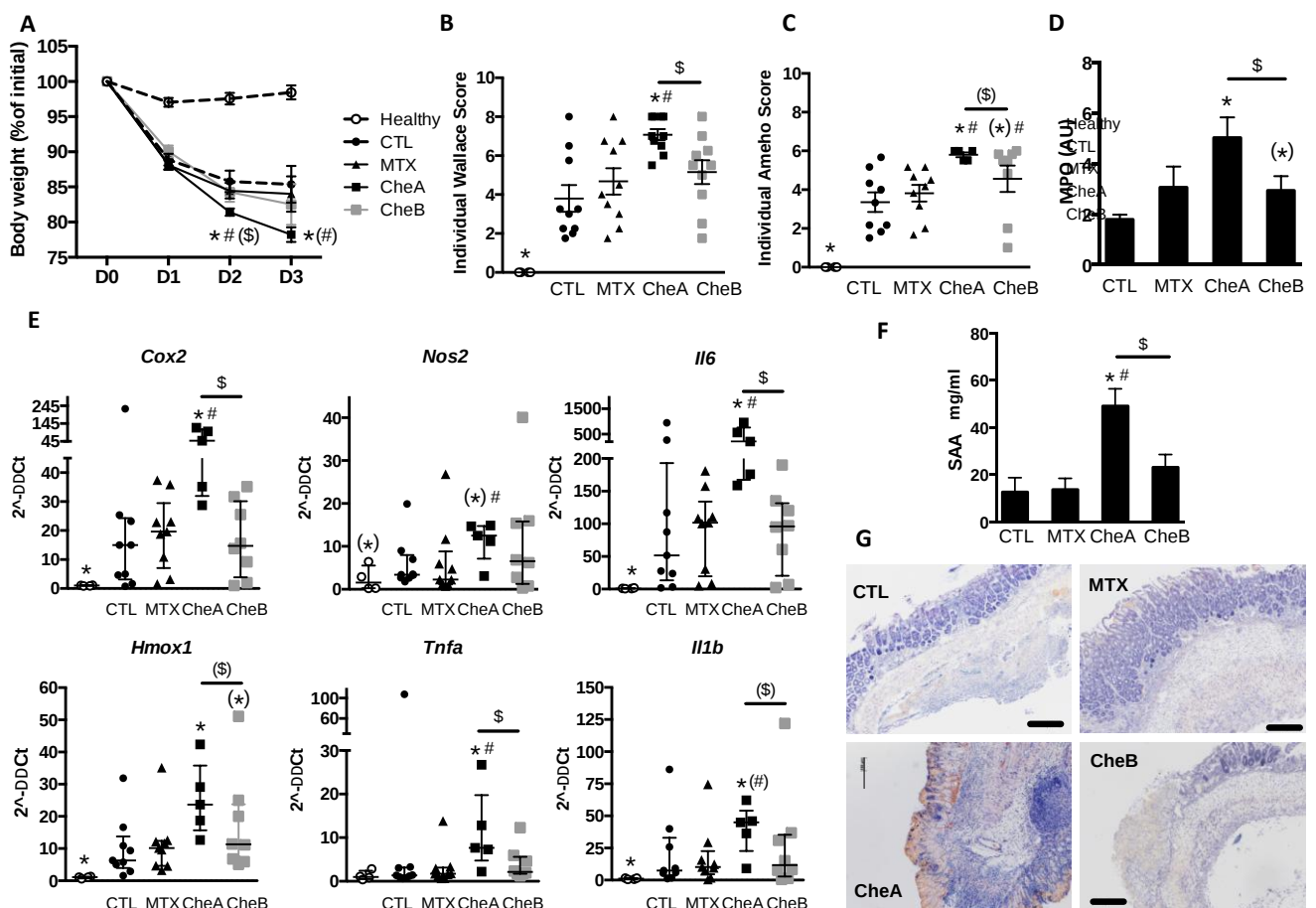


Figure 3. Impact of dietary cheeses on three-day TNBS colitis in mice. (A) Body weight loss (as a percentage of the initial weight) in the healthy, PBS control (CTL), milk matrix (MTX), cheese A (CheA) and cheese B (CheB) groups. (B) Wallace macroscopic scores. (C) Ameho histological scores. (D) Myeloperoxidase activity (MPO). (E) Transcription of inflammatory genes in the colon. (F) Serum Amyloid A protein (SAA) levels. The data represent the mean ($\pm$ SD) of 10 mice per group, (* $p < 0.05$ vs. the control group; (*) $0.05 < p < 0.1$ vs. the control group; # $p < 0.05$ vs. the MTX group; (#) $0.05 < p < 0.1$ vs. the MTX group; \$ $p < 0.05$ vs. the CheA group; (\$) $0.05 < p < 0.1$ vs. the MTX group. (G) Representative histologic preparations of the colon (May-Grünwald-Giemsa staining) from mice from the various groups. Scale bars: 200 μ m.

4. Discussion

In the present study, we addressed the immunostimulatory diversity among microorganism mixes and thus the potential impact of the widely consumed, live, food-borne microbes found in cheese-ripening ecosystems. Our results clearly showed that bacterial and yeast consortia are not immunologically inert *in vitro*. Based on the immunomodulatory profiles of individual microbial strains, the immune response associated with the reconstituted mixtures could be predicted to some extent (at least for the IL-10 read-out). Although removing an anti-inflammatory strain from an anti-inflammatory cocktail may appear empiric and cannot necessarily be generalized to other situations, this approach seems to preserve the overall anti-inflammatory balance. Adding or changing an immune-enhancing strain may reverse or lower the immunomodulatory response.

As previously shown by our group (Foligne et al., 2007), screening for probiotics with PBMCs (based on the IL-10/IL-12 ratio) is mostly predictive of *in vivo* anti-inflammatory efficacy, especially in the TNBS model of colitis. This correlation was less clear in the DSS mouse model of chemically induced experimental colitis. Although these models mimic some (but not all) of the aspects of human IBD and thus must be interpreted with caution, they are useful for studying probiotic-host interactions (Claes, De Keersmaecker, Vanderleyden, & Lebeer, 2011). The acute DSS colitis model appears to be more appropriate for assessing epithelial barrier function and microbial translocation. In contrast, immunocompetent T and B cells are required for the onset of hapten-induced colitis in the TNBS model. Furthermore, the DSS model also evokes features associated with Th2-like colitis and UC. Thus, it is not surprising that some treatments or nutritional intervention(s) may be protective in one model but not in another (as observed for smoking risk factors in CD vs. UC and in TNBS vs. DSS models (Montbarbon et al., 2013). We also observed that some yeasts might be able to alleviate colitis even though they did not induce high cytokine levels *in vitro*; this suggests that the yeast's impact on inflammation was correlated with epithelial cell signaling (Foligné, Dewulf, Vandekerckove, Pignède, & Pot, 2010). Our present results have clearly established that *in vitro* immunoprofiling of human PBMCs is a powerful tool for screening food-borne bacteria and foodborne ecosystems containing high proportions of fungi, Gram-positive bacteria and Gram-negative bacteria, extending previous data from pure cultures to mixtures.

The present study's main objective was to determine whether the microbial composition of a fermented diet modified the inflammation in murine models. Given that the various microbial consortia had similar cell counts, metabolic pathways and survival aptitudes in the gut, the main phenotypic differences were related to immune determinants. However, the impact of the two

“opposite” cheeses on the resident microbiota needs be explored further, in order to characterize and understand the role(s) of cheese-derived microorganisms in IBD. Furthermore, models of T-cell-mediated colitis based on the adoptive transfer of T cells in immunodeficient mice (a Th1-type cytokine-mediated hyperresponse model known to be modulated by the gut microbiota and probiotics (Philippe et al., 2011) are likely to provide valuable information prior to clinical studies. In a view to consider the design of functional foods, the whole physiology of the various strains, considering the survival of strains in the product (Tripathi, & Giri, 2014), adhesion to epithelial cells (Monteagudo-Mera et al., 2012), immune profile and regulatory mechanisms of microorganisms (Ashraf, Vasiljevic, Day, Smith, & Donkor, 2014), alone and in combination, have to be taken into account, together with metabolites and the occurrence of milk-derived peptides, that can be either anti- (Korhonen, 2009) or pro-inflammatory (Ul-Haq, Kapila, & Saliganti, 2014). Then the final product can be evaluated in reliable models for disease’s susceptibility.

In conclusion, the present results further improve our knowledge of the biological activities of cheese-ripening microflora in IBD. Extrapolation of the results of nutritional and inflammatory studies in mice to humans is problematic (Leist, & Hartung, 2013; Seok et al., 2013), and further robust epidemiological and clinical studies in humans are required. However, in view of the massive intake of microorganisms through cheese consumption, one should not neglect the microorganisms' impact on the immune balance and overall health. Pre-illness dietary habits should also be studied. On this basis, one can seek to design cheeses with anti-inflammatory properties for the prevention of colitis (either by maintaining remissions or limiting relapses). This type of ecological, microbiota-targeted therapy would complement other (often expensive) treatments. Furthermore, cheeses with immune-enhancing properties could be of value for specific application such as boosting vaccine responses. Taken as a whole, our present results suggest that there are technological opportunities for cheese making in diet management, nutritional advice and food design for further benefits (Rajasekaran, & Kalaivani, 2013). Seksik et al. have questioned whether dietary probiotics, prebiotics or synbiotics have a role in the treatment of patients with IBD (Seksik, Dray, Sokol, & Marteau, 2008); the same question can be asked of cheeses. The answer is "yes" but greatly depends on the individual patient and the specific etiological, immunological and microbiotic features of IBD (Colombel, Watson, & Neurath, 2008). This echoes Hippocrates' advice more than two thousand years ago: “let your food be your medicine and your medicine be your food”.

Acknowledgments

We thank Dr. Nicolas Blondiaux (Institut de Microbiologie, Lille University Medical Center, Lille, France) for managing the mass spectrometry analysis. We also thank Katharina Mann-Baërt and Michael Enthall for fruitful advice.

Conflict of Interest Statement: The authors have no conflicts of interest to disclose.

Supplementary data

Table S1. List of the microbial strains and condition for growth used in the present study

Micro-organism species	Strain	Origin	Media	Growth conditions, °C ; rpm
<i>Lactococcus lactis</i>	S3	Cheese	M17	30°C - static
<i>Brevibacterium aurantiacum</i>	ATCC 9174	Cheese (Romadur)	BHI	25°C – 250 rpm
<i>Arthrobacter arilaitensis</i>	Re 117 ^T	Cheese (Reblochon)	BHI	25°C – 200 rpm
<i>Corynebacterium casei</i>	1-3b	Cheese (Livarot)	BHI	25°C – 200 rpm
<i>Corynebacterium casei</i>	DPC S298 ^T	Cheese (Gubbeen)	BHI	25°C – 200 rpm
<i>Hafnia alvei</i>	GB001		BHI	25°C – 200 rpm
<i>Hafnia alvei</i>	Type 2 n°920	Dairy product	BHI	25°C – 200 rpm
<i>Staphylococcus equorum</i>	1265/GM16	Cheese (Camembert)	BHI	25°C – 200 rpm
<i>Staphylococcus equorum</i>	Mu206	Cheese (Munster)	BHI	25°C – 200 rpm
<i>Debaryomyces hansenii</i>	CLIB 623	Cheese	PDB	25°C – 200 rpm
<i>Kluyveromyces lactis</i>	CLIB 683	Cheese	PDB	25°C – 200 rpm
<i>Geotrichum candidum</i>	ATCC 204307	Cheese (Pont l'évêque)	PDB	25°C – 200 rpm
<i>Geotrichum candidum</i>	UCMA 103	Cheese	PDB	25°C – 200 rpm
<i>Penicillium camemberti</i>	FM 13	Cheese	PDB	25°C – 200 rpm
<i>Lactococcus lactis</i>	MG1363	Commercial strain	M17	30°C - 200 rpm
<i>Escherichia coli</i>	TG1	Laboratory strain		37 °C - static
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	NCFM	Commercial strain	MRS	37 °C - static
<i>Lactobacillus salivarius</i>	Ls 33	Commercial strain	MRS	37 °C - static
<i>Bifidobacterium longum</i>	Bb536	Commercial strain	MRS-cysteine	37 °C - static

Table S2: list of targeted genes and corresponding primer accession numbers

Gene name	Abbreviation	Commercial reference
Actin beta	<i>ActB</i>	Mm 01205647_g1
Nitric oxide synthase 2 (inducible)	<i>Nos2</i>	Mm 00440502_m1
Heme oxidase 1	<i>Hmox1</i>	Mm 00516004_m1
Tumor necrosis factor	<i>Tnf</i>	Mm 00443258_m1
Interleukin 1 beta	<i>Il1b</i>	Mm 01336189_m1
Prostaglandin synthase 2	<i>Ptgs2 (Cox2)</i>	Mm 00478374_m1
Interleukin 6	<i>Il6</i>	Mm 00439614_m1

References

- Ameho, C. K., Adjei, A. A., Harrison, E. K., Takeshita K., Morioka, T., Arakaki, Y., Ito, E., Suzuki, I., Kulkarni, A. D., Kawajiri, A., & Yamamoto, S. (1997). Prophylactic effect of dietary glutamine supplementation on interleukin 8 and tumor necrosis factor alpha production in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis. *Gut*, 41, 487-493.
- Araujo, R., Rodrigues, A. G., & Pina-Vaz, C., (2004). A fast, practical and reproducible procedure for the standardization of the cell density of an *Aspergillus* suspension: *Journal of Medical Microbiology*, 53, 783-786.
- Ashraf, R., Vasiljevic, T., Day, S.L., Smith, S.C., Donkor, O.N. (2014). Lactic acid bacteria and probiotic organisms induce different cytokine profile and regulatory T cells mechanisms. *Journal of Functional Foods*, 6, 395-409.
- Aune, D., Lau, R., Chan, D. S., Vieira, R., Greenwood, D. C., Kampman, E., & Norat, T. (2012). Dairy products and colorectal cancer risk: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Annals of Oncology*, 23, 37-45.
- Bach, J. F. (2002). The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *New England Journal of Medicine*, 347, 911-920.
- Beermann, C., & Hartung, J. (2013). Physiological properties of milk ingredients released by fermentation. *Food & Function*, 4, 185-199
- Birrenbach, T., & Bocker, U. (2004). Inflammatory bowel disease and smoking: a review of epidemiology, pathophysiology, and therapeutic implications. *Inflammatory Bowel Diseases*, 10, 848-859.
- Blondiaux, N., Gaillot, O., & Courcol, R. J., (2010). MALDI-TOF mass spectrometry to identify clinical bacterial isolates: evaluation in a teaching hospital in Lille. *Pathologie Biologie (Paris)*, 58, 55-57.
- Bradley, P. P., Priebat, D. A., Christensen, R. D., & Rothstein, G. (1982). Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *Journal of Investigative Dermatology*, 78, 206-209.
- Chapman, C. M., Gibson, G. R., & Rowland, I. (2011). Health benefits of probiotics: are mixtures more effective than single strains? *European Journal of Nutrition*, 50, 1-17.
- Claes, I. J., De Keersmaecker, S. C., Vanderleyden, J., & Lebeer, S. (2011). Lessons from probiotic-host interaction studies in murine models of experimental colitis. *Molecular Nutrition and Food Research*, 55, 1441-1453.
- Clarke, J. O., & Mullin, G. E. (2008). A review of complementary and alternative approaches to immunomodulation. *Nutrition in Clinical Practice*, 23, 49-62.
- Colombel, J. F., Watson, A. J., & Neurath, M. F. (2008). The 10 remaining mysteries of inflammatory bowel disease. *Gut*, 57, 429-433.

Cosnes, J. (2004). Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology*, 18, 481-496.

David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., Ling, A. V., Devlin, A. S., Varma, Y., Fischbach, M. A., Biddinger, S.B., Dutton, R. J., & Turnbaugh, P. J. (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 505, 559-563.

Drouault-Holowacz, S., Foligné, B., Dennin, V., Goudercourt, D., Terpend, K., Burckel, A., & Pot, B. (2006). Anti-inflammatory potential of the probiotic dietary supplement Lactibiane Tolérance: *in vitro* and *in vivo* considerations. *Clinical Nutrition*, 25, 994-1003.

Foligné, B., Daniel, C., & Pot, B. (2013). Probiotics from research to market: the possibilities, risks and challenges. *Current Opinion in Microbiology*, 16, 284-292.

Foligne, B., Dessein, R., Marceau, M., Poirer, S., Chamaillard, M., Pot, B., Simonet, M., & Daniel, C. (2007). Prevention and treatment of colitis with *Lactococcus lactis* secreting the immunomodulatory *Yersinia* LcrV protein. *Gastroenterology*, 133, 862-874.

Foligné, B., Dewulf, J., Vandekerckove, P., Pignède, G., & Pot, B. (2010). Probiotic yeasts: anti-inflammatory potential of various non-pathogenic strains in experimental colitis in mice. *World Journal of Gastroenterology*, 16, 2134-2145.

Foligne, B., Nutten, S., Grangette, C., Dennin, V., Goudercourt, D, Poirer, S., Dewulf, J., Brassart, D., Mercenier, A., & Pot, B. (2007). Correlation between *in vitro* and *in vivo* immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World Journal of Gastroenterology*, 13, 236-243.

Gentschew, L., & Ferguson, L. R. (2012). Role of nutrition and microbiota in susceptibility to inflammatory bowel diseases. *Molecular Nutrition and Food Research*, 56, 524-535.

Gionchetti, P., Calafiore, A., Pratico, C., Laureti, S., Vitali, G., Poggioli, G., Campieri, M., & Rizzello, F. (2012). Randomized controlled trials in pouchitis. *Reviews on Recent Clinical Trials*, 7, 303-306.

Hart, A. L., Lammers K., Brigidi, P., Vitali, B., Rizzello, F., Gionchetti, P., Campieri, M., Kamm, M. A., Knight, S. C., & Stagg, A. J. (2004). Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. *Gut*, 53, 1602-1609.

Hartmann, G., Bidlingmaier, C., Siegmund, B., Albrich, S., Schulze, J., Tschoep, K., Eigler, A., Lehr, H. A., & Endres, S. (2000). Specific type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram mitigates experimental colitis in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 292, 22-30.

Hoarau, C., Martin, L., Faugaret, D., Baron, C., Dauba, A., Aubert-Jacquín, C., Velge-Roussel, F., & Lebranchu, Y. (2008). Supernatant from bifidobacterium differentially modulates transduction signaling pathways for biological functions of human dendritic cells. *Plos One*, 3, e2753.

Hosoya, T., Ogawa, A., Sakai, F., & Kadooka, Y. (2012). A cheese-containing diet modulates immune responses and alleviates dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. *Journal of Dairy Science*, 95, 2810-2818.

- Khosravi, A., Yáñez, A., Price, J. G., Chow, A., Merad, M., Goodridge, H. S., & Mazmanian, S. K. (2014). Gut microbiota promote hematopoiesis to control bacterial infection. *Cell Host & Microbe*, 15, 374-381.
- Korhonen, H. (2009). Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of Functional Foods*, 1, 177-187
- Labonte, M. E., Couture, P., Richard, C., Desroches, S., & Lamarche B. (2013). Impact of dairy products on biomarkers of inflammation: a systematic review of randomized controlled nutritional intervention studies in overweight and obese adults. *American Journal of Clinical Nutrition*, 97, 706-717.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. C. (2010). Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nature Reviews in Microbiology*, 8, 171-184.
- Leist, M., & Hartung, T. (2013). Inflammatory findings on species extrapolations: humans are definitely no 70-kg mice. *Archives of Toxicology*, 87, 563-567.
- López, P., Gueimonde, M., Margolles, A., & Suárez A. (2010). Distinct Bifidobacterium strains drive different immune responses *in vitro*. *International Journal of Food Microbiology*, 138, 157-165.
- Maccaferri, S., Klinder, A., Brigidi, P., Cavina, P., & Costabile, A. (2012). Potential probiotic *Kluyveromyces marxianus* B0399 modulates the immune response in Caco-2 cells and peripheral blood mononuclear cells and impacts the human gut microbiota in an *in vitro* colonic model system. *Applied and Environmental Microbiology*, 8, 956-964.
- Maconi, G., Ardizzone, S., Cucino, C., Bezzio, C., Russo, A. G., & Bianchi Porro, G. (2010). Pre-illness changes in dietary habits and diet as a risk factor for inflammatory bowel disease: a case-control study. *World Journal of Gastroenterology*, 16, 4297-4304.
- Marteau, P., Lepage, P., Mangin, I., Suau, A., Doré, J., Pochart, P., & Seksik, P. (2004). Review article: gut flora and inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 20, 18-23.
- Montbarbon, M., Pichavant, M., Langlois, A., Erdual, E., Maggiotto, F., Neut, C., Mallevaey, T., Dharancy, S., Dubuquoy, L., Trottein, F., Cortot, A., Desreumaux, P., Gosset, P., & Bertin B. (2013). Colonic inflammation in mice is improved by cigarette smoke through iNKT cells recruitment. *Plos One*, 8, e62208.
- Monteagudo-Mera, A., Rodríguez-Aparicio, L., Rúa, J., Martínez-Blanco, H., Navasa, N., García-Armesto M. R., & Ferrero M. A. (2012). *In vitro* evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. *Journal of Functional Foods*, 4, 531-541
- Mounier, J., Gelsomino, R., Goerges, S., Vancanney, M., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., Scherer, S., Swings, J., Fitzgerald, G. F., & Cogan, T. M. (2005). Surface microflora of four smear-ripened cheeses. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 6489-6500.

- Ng, S. C., Bernstein, C. N., Vatn, M. H., Lakatos, P. L., Loftus, E. V., Jr., Tysk, C., O'Morain, C., Moum, B., & Colombel J. F. (2013). Geographical variability and environmental risk factors in inflammatory bowel disease. Epidemiology and Natural History Task Force of the International Organization of Inflammatory Bowel Disease (IOIBD). *Gut*, 62, 630-649.
- Nova, E., Wärnberg, J., Gómez-Martínez, S., Díaz L.E., Romeo, J., & Marcos, A. (2007). Immunomodulatory effects of probiotics in different stages of life. *British Journal of Nutrition*, 1, S90-S95.
- Peran, L., Camuesco, D., Comalada, M., Nieto, A., Concha, A., Diaz-Ropero, M. P., Olivares, M., Xaus, J., Zarzuelo, A., & Galvez, J. (2005). Preventative effects of a probiotic, *Lactobacillus salivarius* ssp. *salivarius*, in the TNBS model of rat colitis. *World Journal of Gastroenterology*, 11, 5185-5192.
- Petrof, E. O., Claud, E. C., Gloor, G. B., & Allen-Vercoe, E. (2013). Microbial ecosystems therapeutics: a new paradigm in medicine? *Beneficial Microbes*, 4, 53-65.
- Philippe, D., Favre, L., Foata, F., Adolfsson, O., Perruisseau-Carrier, G., Vidal, K., Reuteler, G., Dayer-Schneider, J., Mueller, C., & Blum, S. (2011). *Bifidobacterium lactis* attenuates onset of inflammation in a murine model of colitis. *World Journal of Gastroenterology*, 17, 459-469.
- Rachmilewitz, D., Katakura, K., Karmeli, F., Hayashi, T., Reinus, C., Rudensky, B., Akira, S., Takeda, K., Lee, J., Takabayashi, K., & Raz, E. (2004). Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology*, 126, 520-528.
- Rahman, A., Gleinser, M., Lanhers, M. C., Riedel, C. U., Foligné, B., Hanse, M., Yen, F. T., Klouj, A., Afzal, M., Back, A., Mangavel, C., Cailliez-Grimal, C., Revol-Junelles, A. M., & Borges F. (2013). Survival of the psychrotrophic bacterium *Carnobacterium maltaromaticum* LMA 28 in the mice gastrointestinal tract, adhesion and immune consideration to human cells. *International Dairy Journal*, 34, 93-99.
- Rajasekaran, A., & Kalaivani, M. (2013). Designer foods and their benefits: A review. *Journal of Food Science and Technology*, 50, 1-16.
- Rajendran, N., & Kumar, D. (2010). Role of diet in the management of inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, 16, 1442-1448.
- Riedel, C. U., Foata, F., Philippe, D., Adolfsson, O., Eikmanns, B. J., & Blum, S. (2006). Anti-inflammatory effects of bifidobacteria by inhibition of LPS-induced NF-kappaB activation. *World Journal of Gastroenterology*, 12, 3729-3735.
- Romanin, D., Serradell, M., González, Maciel, D., Lausada, N., Garrote, G. L., & Rumbo, M. (2010). Down-regulation of intestinal epithelial innate response by probiotic yeasts isolated from kefir. *International Journal of Food Microbiology*, 140, 102-108.
- Roselli, M., Finamore, A., Nuccitelli, S., Carnevali, P., Brigidi, P., Vitali, B., Nobili, F., Rami, R., Garaguso, I., & Mengheri, E. (2009). Prevention of TNBS-induced colitis by different *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains is associated with an expansion of gamma delta T and regulatory T cells of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Inflammatory Bowel Diseases*, 15, 1526-1536.

Seksik, P., Dray, X., Sokol, H., & Marteau, P. (2008). Is there any place for alimentary probiotics, prebiotics or synbiotics, for patients with inflammatory bowel disease? *Molecular Nutrition and Food Research*, 52, 906-912.

Seok, J., Warren, H. S., Cuenca, A. G., Mindrinos, M. N., Baker, H. V., Xu, W., Richards, D. R., McDonald-Smith, G. P., Gao, H., Hennessy, L., Finnerty, C. C., López, C. M., Honari, S., Moore, E. E., Minei, J. P., Cuschieri, J., Bankey, P. E., Johnson, J. L., Sperry, J., Nathens, A. B., Billiar, T. R., West, M. A., Jeschke, M. G., Klein, M. B., Gamelli, R. L., Gibran, N. S., Brownstein, B. H., Miller-Graziano, C., Calvano, S. E., Mason, P. H., Cobb, J. P., Rahme, L. G., Lowry, S. F., Maier, R. V., Moldawer, L. L., Herndon, D. N., Davis, R. W., Xiao, W., & Tompkins R. G. (2013). Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, U S A*, 110, 3507-3512.

Stanton, C., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Van Sinderen, D. (2005). Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Current Opinion in Biotechnology*, 16, 198-203.

Timmerman, H. M., Koning, C. J., Mulder, L., Rombouts, F. M., & Beynen, A. C. (2004). Monostrain, multistain and multispecies probiotics:-A comparison of functionality and efficacy. *International Journal of Food Microbiology*, 96, 219-233.

Timmerman, H. M., Niers, L. E., Ridwan, B. U., Koning, C. J., Mulder, L., Akkermans, L. M., Rombouts, F. M., & Rijkers, G. T. (2007). Design of a multispecies probiotic mixture to prevent infectious complications in critically ill patients. *Clinical Nutrition*, 26, 450-459.

Tripathi, M. K., & Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, 9, 225-241.

Ul Haq, M. R., Kapila, R., & Saliganti, V. (2014). Consumption of β -casomorphins-7/5 induce inflammatory immune response in mice gut through Th2 pathway. *Journal of Functional Foods*, 8, 150-160.

van Baarlen, P., Wells, J. M., & Kleerebezem, M. (2013). Regulation of intestinal homeostasis and immunity with probiotic lactobacilli. *Trends in Immunology*, 34, 208-215.

Viladomiu, M., Hontecillas, R., Yuan, L., Lu, P., & Bassaganya-Riera J. (2013). Nutritional protective mechanisms against gut inflammation. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24, 929-939.

Wallace, J. L., MacNaughton, W. K., Morris, G. P., & Beck, P. L. (1989). Inhibition of leukotriene synthesis markedly accelerates healing in a rat model of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 96, 29-36.

Zvirbliene, A., Kiudelis, G., Zalinkevicius, R., & Kupcinskas, L. (2006). Dietary characteristics of patients with inflammatory bowel diseases. *Medicina (Kaunas)*, 42, 895-899.

3. Résultats marquants

D'une manière générale, le gavage au PBS ou à la matrice gel emprésuré n'ont pas pu être significativement discriminé l'un de l'autre selon les paramètres choisis, quels que soient les groupes (i.e. témoins, colite-DSS ou colite-TNBS). Les fromages (A) et (B) n'ont pas perturbé l'homéostasie d'individus sains.

Les groupes « colite-DSS » gavés au fromage (A) et au fromage (B) ont tous deux montré une tendance –statistiquement non significative– à l'aggravation des paramètres suivis pour caractériser l'inflammation du côlon, sans permettre de séparer les deux groupes. Cela nous a conduits à l'hypothèse que l'afflux de micro-organismes exogènes et leur translocation, plus que leur caractère pro-ou anti-inflammatoire, étaient responsable de la tendance à l'aggravation observée.

Les groupes « colite-TNBS » gavés au PBS, à la matrice gel emprésuré et au fromage (B) n'ont pas montré d'aggravation des paramètres suivis. En revanche, le groupe gavé au fromage (A) a montré une perte de poids significativement plus importante que les trois autres groupes, ainsi qu'une aggravation de l'inflammation systémique et des lésions observées au niveau du côlon.

En conclusion, nous pouvons dire que la consommation d'un fromage composé de micro-organismes aux potentiels immunomodulateurs *a priori* pro- ou anti-inflammatoire, ne perturbe pas l'homéostasie intestinale d'un individu sain. En revanche, en cas de maladie inflammatoire de l'intestin, les modèles précliniques utilisés indiquent que (i) la translocation des micro-organismes au sein d'une muqueuse inflammée n'est pas anodine, (ii) la consommation d'un fromage plutôt pro-inflammatoire peut aggraver les symptômes.

Ainsi, la flore d'affinage des fromages à pâte molle n'est pas neutre d'un point de vue immunomodulateur concernant une inflammation de type IBD. Ce point et ses implications plus générales seront abordés dans les perspectives du manuscrit.

Chapitre 4 : Caractérisation de la réponse au stress digestif *in vitro* « batch » d'une bactérie à Gram-négatif et d'une bactérie à Gram-positif par des outils moléculaires

1. Présentation de l'article 4 en construction

L'objectif de cette dernière partie de la thèse était de caractériser plus finement la réponse au stress digestif de deux micro-organismes, leur choix ayant été effectué en fonction des résultats obtenus dans les chapitres précédents. Des outils moléculaires ont été utilisés avec (i) de la transcriptomique, (ii) de la protéomique, et (iii) la validation de certaines hypothèses par la mise en évidence de métabolismes particuliers. Les stress majeurs auxquels sont soumis les micro-organismes lors de la digestion sont la chute de pH, la présence de sels biliaires et la raréfaction puis la quasi absence d'oxygène (anoxie). Le stress éventuel de la rencontre avec le microbiote intestinal et ses métabolites n'a pas été abordé dans ces travaux.

Les travaux disponibles actuellement sur la réponse au stress digestif de bactéries, concernent surtout les micro-organismes probiotiques ou pathogènes. La résistance au stress acide des bactéries à Gram-positif a été revue de manière assez exhaustive par Cotter and Hill (2003) et, bien que cette revue ait plus de 10 ans, elle reste encore très pertinente. Une revue plus récente de Krulwich et al. (2011) complète les observations de la première revue, en y apportant un aspect mécanistique plus poussé traitant des bactéries à Gram-négatif. Citons aussi les travaux importants et de l'équipe de J. Slonczewski (2009) portant sur le maintien du pH intracellulaire lors de stress acide intense et, notamment, la mise en place de méthode permettant de mesurer ce pH. Les mécanismes de résistance aux sels biliaires ont été décrits dans la revue de Begley et al. (2005) et, surtout, bien caractérisés chez les entérobactéries ainsi que chez certains probiotiques comme les lactobacilles et le genre *Propionibacterium*.

Dans ce contexte de littérature ne traitant pas de micro-organismes « alimentaires » au sens technologique, notre premier choix s'est porté sur la bactérie à Gram-positif *Staphylococcus equorum* Mu2, cette souche ayant montré un potentiel anti-inflammatoire (Chapitre 1) ainsi qu'une certaine sensibilité au stress gastrique batch, tout en résistant au passage à travers le DIDGI (Chapitre 2). Le second choix a été la bactérie à Gram-négatif *Hafnia alvei* GB001, cette bactérie s'étant montrée la plus résistante à toutes les conditions de digestion (Chapitre 1) et possédant un profil anti-inflammatoire (Chapitre 1).

Nous avons construit un plan d'expérience reprenant la démarche du stress batch utilisée dans le Chapitre 1, tout en modifiant les conditions de stress gastrique de manière à ce que *S. equorum* Mu2, qui ne survivait pas à ces conditions trop drastiques, conserve une viabilité suffisante pour permettre l'extraction de son ARN pour l'analyse RNAseq. Le stress duodénal a été conservé à l'identique. Le stress combiné a consisté en l'application du stress gastrique modifié, suivi du stress duodénal.

En parallèle, une extraction des protéines a été réalisée concernant les deux micro-organismes après application du stress acide seulement dans l'objectif d'une analyse protéomique ultérieure.

2. Faits marquants

- ✓ Nous avons développé une méthode de digestion *in vitro* statique en deux étapes
- ✓ Les bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif ont différencié par leurs réponses.
- ✓ Nous avons caractérisé la réponse transcriptomique au stress digestif *in vitro* d'une bactérie à Gram-positif et d'une bactérie à Gram-négatif
- ✓ La réponse au stress combiné de la bactérie à Gram-positif ressemble à la réponse au stress gastrique
- ✓ La réponse au stress combiné de la bactérie à Gram-négatif est intermédiaire entre la réponse au stress gastrique et la réponse au stress duodénal

Insights of the transcriptomic *in vitro* digestive stress response of a Gram-positive and a Gram-negative bacterium from cheese origins.

Nadège Adouard^{ab}, Eric Dugat-Bony^b, **Pascal Bonnarme^{*b}**

^a AgroParisTech, Centre de Biotechnologies Agroindustrielles, AgroParisTech INRA, UMR 782 Genie & Microbiologie des Procédés Alimentaires, F-78850 Thiverval Grignon, France

^b INRA, Centre de Biotechnologies Agroindustrielles, AgroParisTech INRA, UMR 782 Genie & Microbiologie des Procédés Alimentaires, F-78850 Thiverval Grignon, France

***Corresponding author pascal.bonnarme@grignon.inra.fr Phone: +33 130 815 388**

Abstract

Although large numbers of viable microorganisms are ingested through ripened cheese consumption, little is known about the microorganisms' ability to withstand digestion. We investigated the resistance to digestive stress of a Gram-positive – *Staphylococcus equorum* Mu2 – and a Gram-negative bacterium – *Hafnia alvei* – constitutive of that ripened cheese microflora. The approach mimicked gastric and/or duodenal digestion. Transcriptional changes were measured using a global RNA-Seq transcriptomic approach and viability of both strains was assessed. *S. equorum* Mu2 was far more sensitive to gastric stress (viability decrease of 3 log CFU/mL) than *H. alvei* GB001 (no significant decrease of viability) and, therefore, more sensitive to a combined stress. Both strains were equally resistant to duodenal challenge. Overall, 1730, 1761 and 2308 genes in *H. alvei* GB001 and 573, 796 and 510 genes in *S. equorum* Mu2, were differentially modified following, respectively, gastric-like, duodenal-like and combined *in vitro* batch stress (p -value <0.05) among a total of 4692 CDS in *H. alvei* GB001 and a total of 2932 CDS in *S. equorum* Mu2. Following gastric-like stress, *H. alvei* GB001 exhibited up-regulated genes of the cysteine metabolism (*cysND*, *cysC* and *cysIJ*) along with glutamate decarboxylation metabolism. Hydrogenases encoding genes from the Hyd complexes were both up- (*hyfFG*) and down-regulated (*hybABCO*, *hypBCD*). *S. equorum* Mu2 up-regulated genes encoding diverse dehydrogenase, among them malate dehydrogenase (*mdh* and *mgo*), along with genes encoding enzymes involved in the polyamine biosynthesis (*potAD*). Both bacteria showed up-regulated genes encoding transporters from the multidrug resistance family (e.g. *emrB* and *acrAB*). *H. alvei* GB001 transcriptomic profile in the combined challenge seems to be an intermediate between the individual stresses whereas *S. equorum* Mu2 displayed a combined stress response very much alike gastric stress.

Highlights

- ✓ We performed a two-steps *in vitro* batch digestive stress experiment.
- ✓ We assessed transcriptomic response to *in vitro* digestive stress of a Gram-positive and a Gram-negative bacteria from cheese origin
- ✓ Gram-positive and Gram-negative bacteria differed in their resistance to digestive challenge.
- ✓ Gram-positive bacteria response to combined challenge looked like gastric challenge
- ✓ Gram-negative bacteria response to combined challenge was intermediate between the individual stress

Keywords

Smear-ripened cheese microbiota, *in vitro* digestive model, digestive stress, transcriptome, RNA-Seq

1. Introduction

Cheese is one of the oldest ways of conserving milk: in Northern Europe, evidence of cheese-making activity has been found at sites dating from the sixth millennium BC (Salque *et al.* 2012). At present, Europe produces around 9000 thousand tons of cheese per annum (Eurostat, 2013), and Europeans eat between 25 and 30 kg of cheese per capita per annum. Given that a gram of cheese contains 10^8 to 10^9 live microorganisms on average (Beresford *et al.* 2001), the annual intake of viable cells can be estimated at 10^{13} to 10^{14} per capita per annum. Thus, a fermented food product like cheese is an important source of diverse microorganisms in the human diet. However, few studies have investigated the survival of the cheese microflora in the gastrointestinal tract. A review of the literature shows that most of the research in this field has focused on Lactobacilli, Bifidobacteria and Propionibacteria (Cousin *et al.* 2011, Saarela *et al.* 2000) with a view to find new probiotics or using cheese as a carrier for known probiotics (Gardiner *et al.* 1999, Saxelin *et al.* 2010). It has been reported that pH is the major stress factor in the gastric compartment, whereas the presence of enzymes has a negligible effect on the microorganisms (Sumeri *et al.* 2012). The impact of the stomach's hydrochloric acid (HCl) on both Gram-positive and Gram-negative bacteria has been well characterized (mainly potential probiotics or pathogens) (Krulwich *et al.* 2011). In contrast, the impact of bile has been less documented (Begley *et al.* 2005) and has focused on food-borne pathogens (e.g. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* (Merritt *et al.* 2009)) or probiotic candidates such as Bifidobacteria and Lactobacilli (Ruiz *et al.* 2013). One of the few studies related to cheese-ripening bacteria found that the genus *Corynebacterium* survived passage through the gastrointestinal tract in human microbiota-associated rats (Lay *et al.* 2004). Cheese-ripening yeasts, such as *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis* and *Geotrichum candidum*, were found to be able to survive *in vitro* challenges with acid and bile (Kumura *et al.* 2004, Lay *et al.* 2004, Psomas *et al.* 2001). However, to date, no study has been focusing on the response to digestive stress of ripening microorganisms, using high throughput molecular tools such as next generation sequencing. Given our previous work related to the ability of a selection of ripening microorganisms to withstand digestive stress along with the characterization of their basic immunomodulatory properties (Adouard *et al.*, 2014 accepted, see Chap. 1; Adouard *et al.* unpublished data, see Chap.2), we selected for this study a Gram-positive bacterium (*Staphylococcus equorum* Mu2) and a Gram-negative bacterium (*Hafnia alvei* GB001) which are of importance in the ripening process of surface-ripened cheese (Irlinger *et al.*, 2009) and whose genome has been sequenced (Irlinger, *personal communication* ; Irlinger *et al.*, 2012).

We implemented a slightly modified version of the three-step *in vitro* digestive batch method used in the previous works (Adouard et al., unpublished data, see Chap.2), consisting of (i) a gastric-like challenge, (ii) a duodenal-like challenge and (iii) a gastric-like followed by a duodenal-like challenge (Adouard et al. 2014, submitted). We used a global transcriptomic analysis based on RNA sequencing to study the transcriptional response of both strains to each of the three *in vitro* stress conditions.

2. Materials & Methods

2.1. Microorganisms

Hafnia alvei GB001 and *Staphylococcus equorum* Mu2 are part of the GMPA strain collection and are both able to grow in cheese environment (Plé et al. 2014).

2.2. Growth and plate count media

Both bacteria were cultured in 100 mL of Brain Heart Infusion broth (BHI: Biokar Diagnosis, Beauvais, France) in 500 mL Erlenmeyer flasks at 25°C, with shaking at 200 rpm. Prior to use in the experiments described below, all strains were grown until they reached the same growth phase (the late stationary phase, as defined in prior growth kinetics experiments; data not shown). Microorganisms were counted on the BHI agar. Prior to plating, cultures were diluted in Maximum Recovery Diluent (MRD, 9 g/L) (Difco, Pessac, France).

The same incubation temperatures were used as for broth cultures.

2.3. In vitro gastric and duodenal batch challenges

The stress conditions and the stress medium's composition were adapted from our previous work (Adouard et al 2014, Chap.2). All digestive juice components were purchased from Sigma (Saint-Quentin-Fallavier, France) and diluted in MRD. Pepsin (P6887, EC 3.4.23.1, activity: 3300 U/mg of protein, calculated using hemoglobin as a substrate), pancreatin (P1750), and bile (B8631) were of porcine origin. The “gastric lipase” was a recombinant enzyme produced in the fungus *Rhizopus oryzae* (80612, EC 3.1.1.3, activity: ≥ 30 U/mg). Simulated gastric and duodenal juices were made fresh daily. Gastric juice consisted in pepsin (0.025 g/L or 1.10^6 U/mL), lipase from *R. oryzae* (0.2 g/L or 6.10^4 U/L) and NaCl (2,75 g/L) suspended in a 0.020 M glycine-HCl buffer pH 4 at 37°C prior to experiments.

Duodenal juice was prepared by suspending pancreatin (9 g/L), bile (30 g/L) and NaCl (7 g/L) in 0.1 M phosphate buffer pH 6.5 at 37°C, prior to the experiments. In a 1000 mL sterile Erlenmeyer, 15 or 20 milliliters of a late-stationary phase culture were added to 135 mL or 130 mL of either gastric or duodenal juice for respectively *S. equorum* Mu2 or *H. alvei* GB001. The pH was checked again after inoculation and (if necessary) re-adjusted to either pH 4 or pH 6.5 using HCL 1M. Compared to the previous stress conditions (Chap.2), the pH of gastric-like conditions was changed from pH 3 for 1h to pH 4.5 for 45 min in such a way *S. equorum*'s Mu2 remaining viability was suitable for RNA extraction and further RNAseq analysis. The incubation times were respectively 45 min and 2 h for gastric and duodenal juices at 37°C, with moderate shaking (100 rpm). The serial stress condition (*i.e.* gastric stress followed by duodenal stress) was performed by adjusting the pH of 45-min gastric juice incubation to 6.5 with 1M Na₂CO₃, and then adding bile and pancreatin under sterile conditions for the subsequent 2 h duodenal incubation.

Control samples were made by incubating each species in MRD instead of the stress media, all else being equal (*i.e.* incubating time of 45 min, 120 min or 165 min, 37°C, final volume 150 mL, 100 rpm shaking table). Control and stressed samples were repeated 4 times. To assess cell survival, strains were counted on the corresponding agar-based media before and after each stress condition.

2.4. RNA extraction

Cells were harvested by centrifugation at 5000 x g for 5 min and pellets were immediately resuspended into 1.5 ml (*S. equorum* Mu2) or 2.1 ml (*H. alvei* GB001) of RLT Buffer containing β-mercaptoethanol (1% V/V) (Qiagen). RNA extraction was performed using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. DNase treatment was performed on 10 µg of total RNA using the TURBO DNA-free kit (Ambion, Grand Island, NY, USA) according to the manufacturer's instructions. Finally, RNA was purified using the RNA cleanup protocol of the RNeasy Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Purified RNA was quantified at 260 nm using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). The quality of the RNA was analyzed with a 2100 Bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, CA, USA) using RNA 6000 NANO chips.

2.5. RNA sequencing and differential analysis

RNA samples were provided to Genome Quebec and McGill University Innovation Centre (Montréal, Québec, Canada) for an additional RNA quality control and for library preparation and sequencing. Briefly, cDNA libraries were prepared using the TruSeq stranded mRNA sample preparation kit and sequenced (100 bp single-end reads) on a HiSeq 2000 instrument (Illumina, San Diego, CA, USA) following the manufacturer's protocol. The quality of sequencing reads was checked with FastQC software V0.10.1 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>).

Trimming, including the removal of adaptators and quality filtering, was performed using Trimmomatic V0.32 (Bolger et al., 2014) with the following parameters: crop = 85, headcrop = 10, leading = 10, trailing = 10, slidingwindow = 4:20, minlen = 60. Then, reads were mapped onto the sequenced genome of *H. alvei* GB001 (total coding DNA sequence (CDS) : 4692 ; accession number PRJEB6257) or *S. equorum* Mu2 (total coding DNA sequence (CDS) : 2932 ; accession number CAJL01000001-CAJL01000030) using the Bowtie mapping software (Langmead et al., 2009), allowing up to one mismatch in alignments. The number of reads uniquely mapped to each gene was determined using HTSeq (Anders et al., 2014).

Differential expression analysis was performed by comparing the number of mapped reads for each gene in the four replicates from two different conditions (stress versus control). First, the count table was filtered to select only data corresponding to CDS features exhibiting more than 200 mapped reads on average. Then, data were normalized by using R and the package DESeq2 (Love et al., 2014).

Finally, differentially expressed genes were identified according to the false discovery rate adjusted Benjamini Hochberg p -value (Benjamini and Hochberg, 1995) implemented within the DESeq2 package and using a cutoff of adjusted p -value < 0.05. Genes showing an adjusted p -value less than 0.05 were considered to have significantly different transcript levels between the stress and control conditions. Functional classification of the transcriptome datasets were performed using the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) annotations (Kanehisa et al., 2012).

3. Results and discussion

3.1. Survival analysis

We assessed the resistance to *in vitro* batch digestive stress of *H. alvei* GB001 and *S. equorum* Mu2 two surface-ripened cheese isolated microorganisms. The incubation under gastric-like stress conditions took place for 45 min with pepsin, at 37°C and pH 4.5 ; duodenal-like stress incubation conditions were 2 h with bile and pancreatic enzymes, at 37°C and pH 6.5. Incubation under gastric-like conditions followed by duodenal-like conditions was also performed.

The strain *H. alvei* GB001 displayed a loss of viability of 0.29 log CFU/mL, 0.51 log CFU/mL and 0.38 log CFU/mL under gastric, duodenal and combined challenge conditions, respectively (Table 1). *S. equorum* Mu2 showed a loss of viability of 3.06 log CFU/mL following exposure to gastric stress, 0.60 log CFU/mL after duodenal challenge and 3.15 log CFU/mL following the combination of stress. Overall, *S. equorum* Mu2 proved to be more sensitive to gastric stress than *H. alvei* GB001, which is consistent with previous works (Adouard et al., unpublished data, Chap.2).

Table 1: Viability of *Hafnia alvei* GB001 and *Staphylococcus equorum* Mu2 before and after *in vitro* batch digestive stress

			Viability (log CFU/mL)
<i>Hafnia alvei</i> GB001	G-like stress	Control	9.40 ± 0.15
		Stress	9.11 ± 0.12
	D-like stress	Control	9.32 ± 0.13
		Stress	8.81 ± 0.12 **
	Combined stress	Control	9.80 ± 0.08
		Stress	9.42 ± 0.14 **
<i>Staphylococcus</i> <i>equorum</i> Mu2	G-like stress	Control	9.56 ± 0.12
		Stress	6.50 ± 0.08 ***
	D-like stress	Control	9.65 ± 0.09
		Stress	9.05 ± 0.14 *
	Combined stress	Control	9.49 ± 0.09
		Stress	6.31 ± 0.06 ***

Results are shown as the mean ± SD, n=3. Viable counts (log CFU/mL) of each strain were compared with a control sample incubated at 37°C in Maximum Recovery Diluent for the same length of time i.e. 45 min, 120 min or 165 min for respectively G-like, D-like and Combine stress.

G-like stress : Gastric challenge ; D-like stress : Duodenal challenge and Combined stress : Gastric followed by duodenal challenge.

The statistical significance of differences between controls and challenged groups was established using a two-tailed Student's t-test. Results are indicated as follows: * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001

3.2. Overview of the transcriptomic dataset

The bacterial transcriptome modifications induced by gastric-like stress (G), duodenal-like stress (D) or a combination of both (C), were determined for a Gram-positive bacterium (*S. equorum* Mu2) and a Gram-negative bacterium (*H. alvei* GB001) by whole transcriptome sequencing (RNA-Seq). To this end, 48 RNA-Seq libraries (24 per bacterial species) were generated and sequenced for a total of >1 billion reads. Sequencing statistics are provided in (Table 2). The number of raw sequence reads per library varied between 16,990,785 and 34,458,232. Most sequences (>90%) passed the quality filtering and mapped the reference genomes.

Table 2: Sequencing statistics and expression data.

	<i>H. alvei</i> GB001	<i>S. equorum</i> Mu2
Total number of reads	651,524,345	524,935,363
Average number of reads/library	27,146,848	21,872,307
Average number of filtered reads/library	25,006,194	20,894,352
Average number of unique mapped reads	24,683,814	20,425,363
Average expression (reads per CDS)	3,164	4,733

Overall, the differential expression analysis allowed to identify 3168 genes for *H. alvei* GB001 (68% of the predicted CDS) and 2456 genes for *S. equorum* Mu2 (84% of the predicted CDS) whose expression was significantly different (adjusted p -value < 0.05) from the control in at least one stress condition (G, D or C). Such variations indicate dramatic metabolic changes under stress conditions for these two microorganisms. A hierarchical clustering (Single Linkage method) of the samples was performed using the correlation matrix built from the expression data corresponding to those genes (Figure 1). This analysis revealed a perfect clustering of biological replicates (4 per stress condition or the corresponding controls) and a clear segregation between stress conditions. Furthermore, it emphasizes the importance of using a set of specific controls for each stress conditions. Indeed, each stress condition had its set of specific controls, namely a sample in which microorganisms were kept in a minimal medium for as long as the stressed was performed in the sample group. The clustering of controls made for each stress condition points out the necessity to use control that are different from a sample taken just before the stress and that does not take into account the period of time during which microorganisms are stressed.

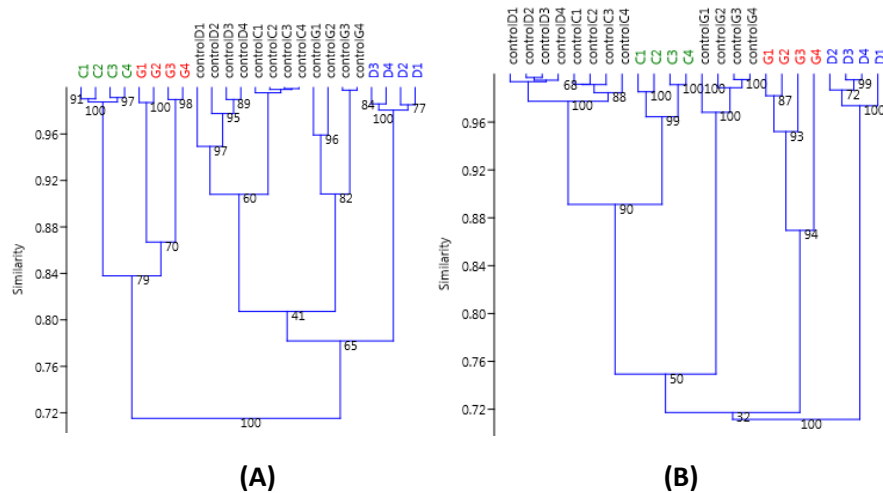


Figure 1 : Hierarchical clustering (Single Linkage method) of (A) *H. alvei* GB001 and (B) *S. equorum* Mu2 samples.

G : gastric-like stress; D: duodenal-like stress; C: combined stress.

Control with corresponding letters. n=4 in each stress and control group. Performed using the correlation matrix built from the expression data corresponding to those genes

3.3. Transcriptional response of *Hafnia alvei* GB001 and *Staphylococcus equorum* Mu2 to *in vitro* batch digestive stress

3.3.1. Overall response

In order to determine which genes were involved in bacterial Gram-negative and Gram-positive response to gastric-like and/or duodenal-like batch digestive stress, we focused on pair-wise comparisons performed between stressed groups and controls. Overall, Table 3 exhibits 1730, 1761 and 2308 genes whose expression was significantly modified in response respectively to gastric-like, duodenal-like and combined *in vitro* batch stress (p -value < 0.05) among a total of 4692 CDS in *H. alvei* GB001. Pair-wise comparisons performed between stressed groups and controls for the *S. equorum* Mu2 gave 573, 796 and 510 genes whose expression was significantly modified in response to G-like, D-like and combined *in vitro* batch stress, respectively (p -value < 0.05); for a total of 2932 CDS in *S. equorum* Mu2 (Table 3). It is of note that, regarding *S. equorum* Mu2, around 50% to 60% of the differentially expressed genes encode for putative or unknown proteins. Such a lack of information makes the search of complete metabolisms very difficult to carry on.

Table 1: General view of up-regulation and down-regulation (adjusted p-value < 0.05) of Coding DNA Sequence (CDS) in *Hafnia alvei* GB001 and *Staphylococcus equorum* Mu2 when exposed to (i) G-like, (ii) D-like and (iii) G-like followed by D-like – i.e. combined- stress

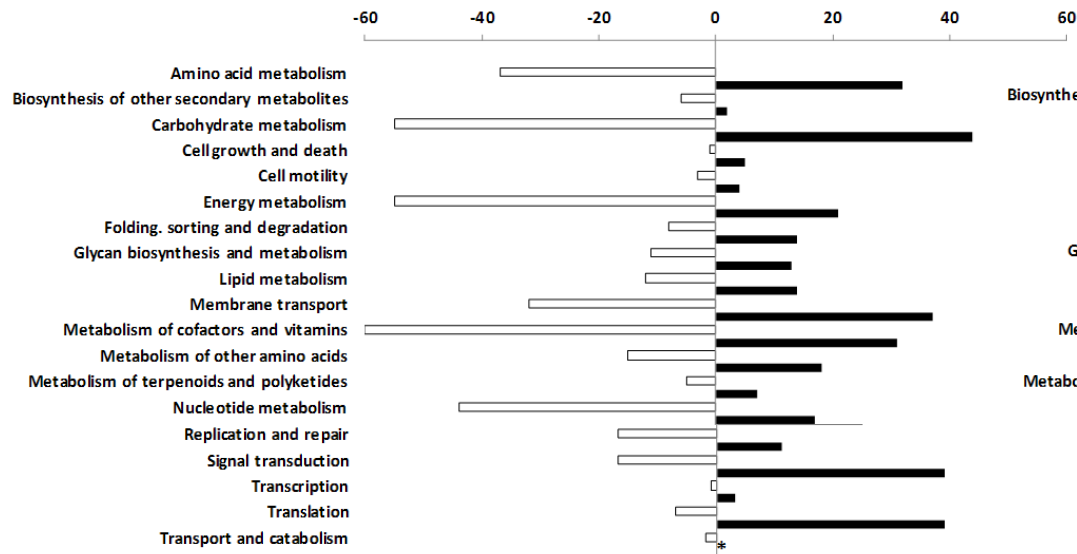
	<i>Hafnia alvei</i> GB001 ⁽¹⁾			<i>Staphylococcus equorum</i> Mu2 ⁽¹⁾		
	Total genome : 4692 CDS			Total genome : 2932 CDS		
	Up-regulated CDS	Down-regulated CDS	%Total CDS (up+down)	Up-regulated CDS	Down-regulated CDS	%Total CDS (up+down)
Gc-like stress	838	892	37	721	558	44
DI-like stress	827	934	38	899	906	62
Combined stress	1174	1132	49	634	668	44

(1) Coding DNA Sequence of the [...] bacterial strain. Genomes available under accession number PRJEB6257 for *H. alvei* GB001 and CAJL01000001-CAJL01000030 for *S. equorum* Mu2.

Figure 2 and Figure 3 show the number of up- and down-regulated genes after each of the three stress conditions for respectively *H. alvei* GB001 and *S. equorum* Mu2. The global expression pattern was evaluated by classifying differentially-expressed genes according to KEGG annotations (Kanehisa et al. 2012). Overall, even though the ranking was slightly different among each stress and bacterial strain, the main functional categories with differentially expressed genes were carbohydrates metabolism, amino acid metabolism, metabolism of cofactors and vitamins, membrane transport, energy metabolism, signal transduction and translation.

From a global perspective, Table 4 and Table 5 showed that, respectively for *H. alvei* GB001 and *S. equorum* Mu2, general stress response genes were significantly up-regulated for the three stress conditions. Indeed, genes such as those encoding molecular chaperons (e.g. *dnaK*, *clpB*, *hscAB*, *hspG*) were up-regulated. Their role is to address and stabilize proteins, by preventing and reversing their aggregation or by degrading irreversibly damaged materials (Hartl et al. 1996). Heat-shock and cold-shock proteins coding genes (namely *ibpA* and *cspE* for *H. alvei* GB001 and *cspA* for *S. equorum* Mu2) were up-regulated as well. They are reported to collaborate with the previously mentioned chaperones to achieve protein sorting, repairing and ultimately degrading, if necessary (Thomas and Baneyx, 1998).

(A) G-like challenge
Hafnia alvei



(B) D-like challenge
Hafnia alvei

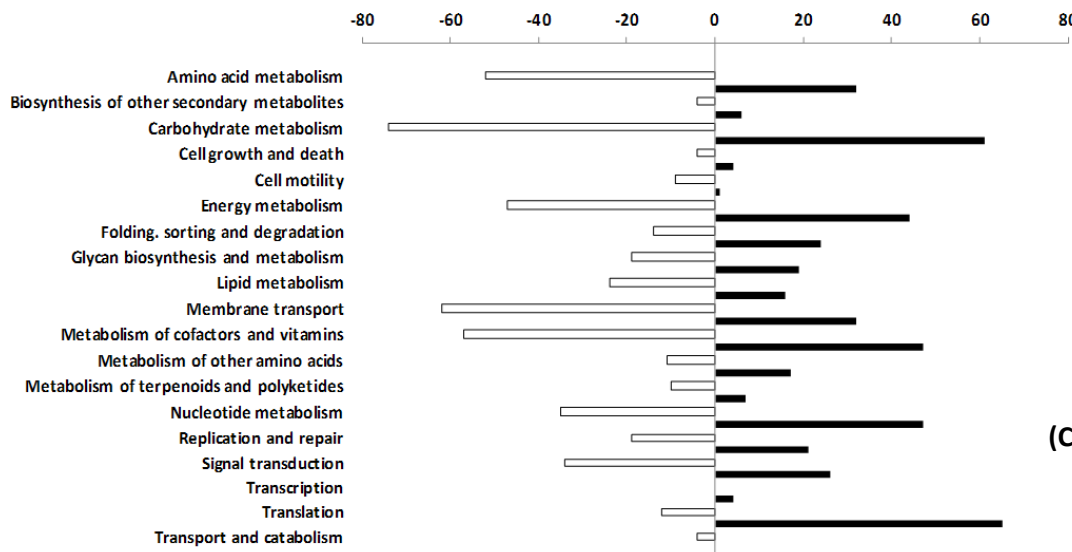
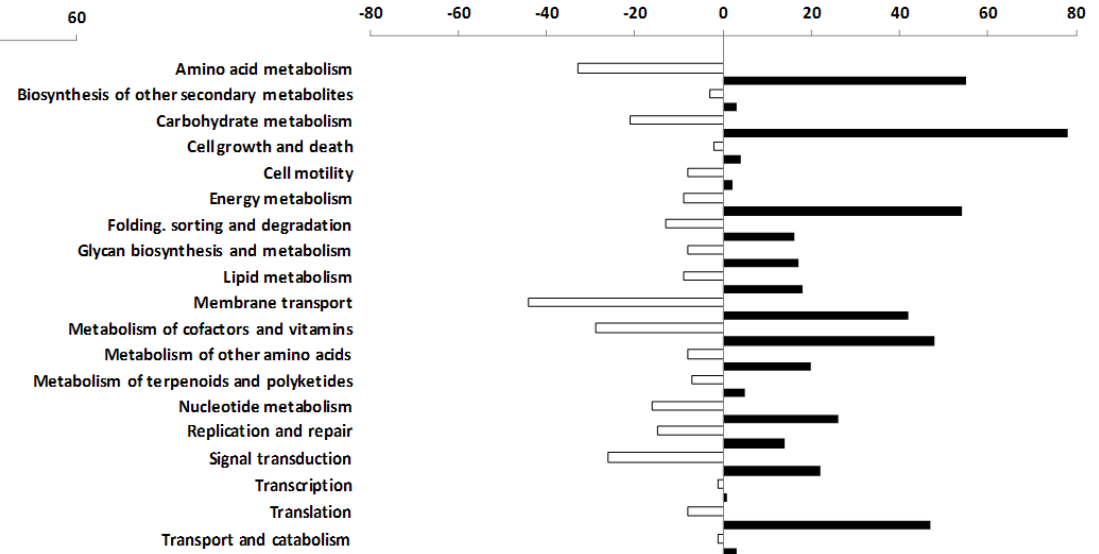


Figure 2: Functional classification of differentially expressed genes for *Hafnia alvei* GB001 after (A) gastric-like (B) duodenal-like and (C) Combined *in vitro* batch stress, compared to control groups. Dark bars : amount of up-regulated genes ; Light bars amount of downregulated genes - in each condition

(C) Combined challenge
Hafnia alvei

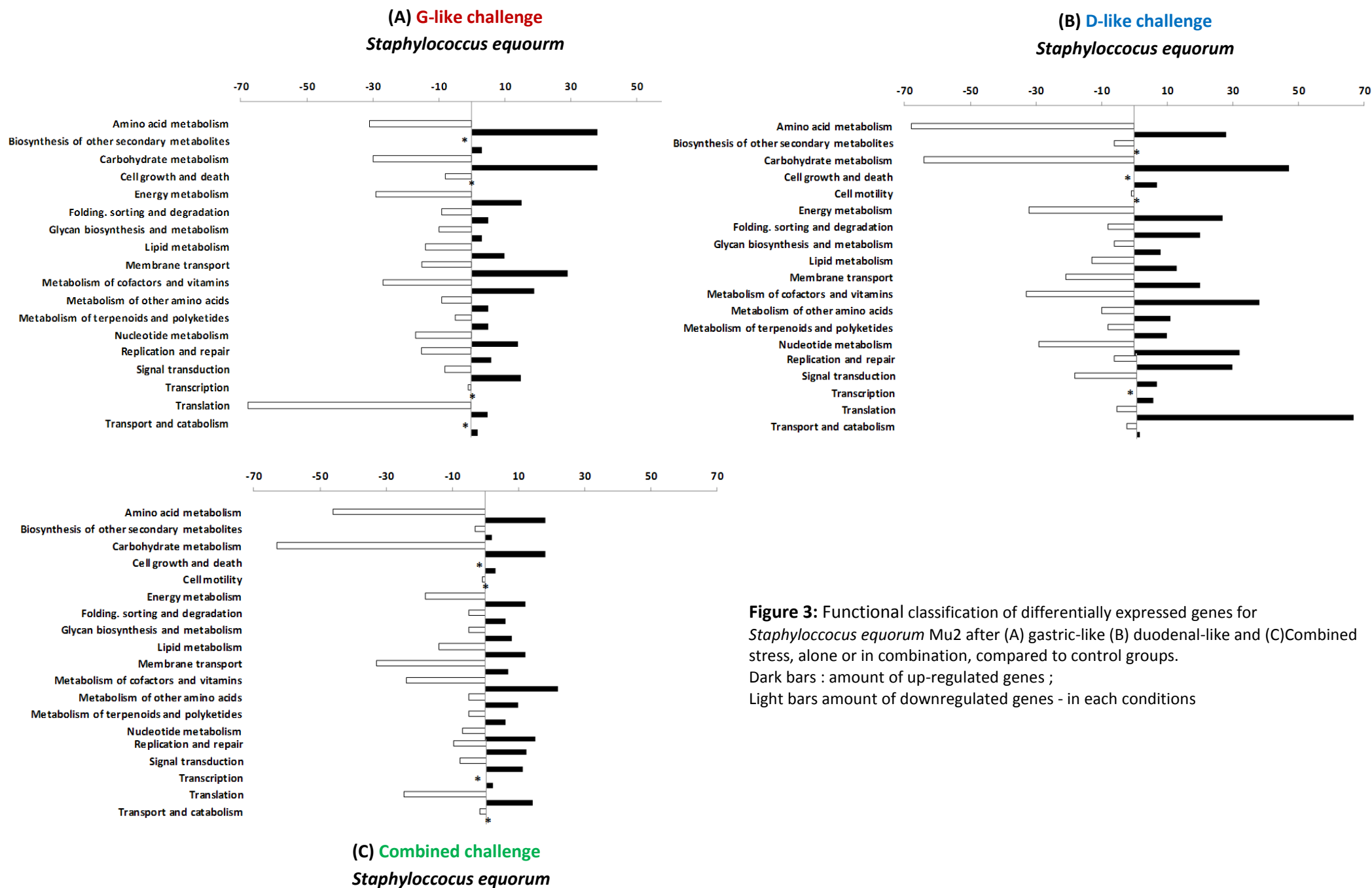


Figure 3: Functional classification of differentially expressed genes for *Staphylococcus equorum* Mu2 after (A) gastric-like (B) duodenal-like and (C) Combined stress, alone or in combination, compared to control groups. Dark bars : amount of up-regulated genes ; Light bars amount of down-regulated genes - in each conditions

3.3.2. Gastric-like stress

Figure 2 (A) and Figure 3 (A) show the number of up- and down-regulated genes per functional categories for *H. alvei* GB001 and *S. equorum* Mu2, respectively, after the gastric-like challenge compared to controls.

As mentioned in the previous section, numerous genes involved in the general stress response were up-regulated (Table 4 and Table 5). For example, the gene encoding the cold shock protein (*cspA*) was up-regulated in both microbial strains. In the particular case of *H. alvei* GB001, the phage shock protein complex (PSP-complexe; encoded by *pspABCD* genes) was also highly up-regulated. It has been reported that this complex helps preventing membrane damage in *Escherichia coli*, and in Gram-negative bacteria in general, in response to a wide range of environmental stresses (Darwin et al., 2006). Interestingly, Darwin et al. demonstrated a PSP-complex induction after the proton motive force (PMF) was dissipated in the cell, and they reported that PSP-complex to be induced when a defect occurred in the assembly of cytochrome O oxidase and F₁-F₀ATP synthase complex. A closer look to the energy metabolism of *H. alvei* GB001 showed that most of the oxidative phosphorylation main genes were repressed - e.g. F₁-F₀ATP synthase complex (encoded by genes *atpABEH*), cytochrome O oxidase complex (encoded by genes *cyoBCDE*) and NADH dehydrogenase complex (encoded by genes *nuoCEFGHKN*). *cyoBCDE* and *nuoCEFGHKN* genes have already been reported to be up-regulated in *E. coli* when submitted to acid stress (Krulwich et al. 2011). *H. alvei* is genetically and metabolically close to *E. coli* (Janda et al., 2002) but does not seem to be able to use its Cyo and Nuo complex in the same way when exposed to an acidic environment. Therefore, as mentioned in Darwin's review conclusion (2006), we can speculate that PSP-complex may have been up-regulated in order to counteract the dysfunctions related to PMF defect and functioned as a signal transduction-like system. As a whole, and for both microorganisms, genes involved in carbohydrates metabolism were generally repressed. As shown in Table 4 and Table 5, major genes coding for enzymes of the TCA cycle (e.g. *sdhAB*, *sucABCD*, *frdABC*) and glycolysis (e.g. *pgi*, *pgk*, *pgm*, *acs*, *fba*, *fbp*) were significantly down-regulated, clearly suggesting that the cells were not using the carbon resources as efficiently to produce energy. Along with the repression of oxidative phosphorylation related genes already mentioned for *H. alvei* GB001 and that occurred as well for *S. equorum* Mu2, we can state that both bacteria tend to limit the use of aerobic respiration in response to gastric-like stress conditions.

Table 4: Selection of genes (CDS) significantly up- or down-regulated in *H. alvei* GB001 after exposure to (i) G-like, (ii) D-like and (iii) G-like followed by D-like stress – i.e. combined- stress

Gene	Product	Log ₂ expression ratio ⁽¹⁾		
		G-like stress	D-like stress	Combined stress
General stress proteins				
<i>clpA</i>	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit	0,85	-	-0,58
<i>clpB</i>	ATP-dependent chaperone protein ClpB	2,80	1,07	2,09
<i>clpP</i>	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	2,05	-	0,80
<i>clpS</i>	ATP-dependent Clp protease adaptor protein ClpS	2,44	-	-
<i>clpX</i>	ATP-dependent serine protease specificity subunit of ClpX-ClpP	1,51	-0,51	-
<i>cspA2</i>	Major cold shock protein	1,97	-	4,54
<i>cspD</i>	Cold shock-like protein CspD	2,96	-1,84	-
<i>cspE</i>	Cold shock protein	1,48	1,57	1,18
<i>dnaJ</i>	Chaperone protein dnaJ	1,62	1,05	1,12
<i>dnaK</i>	Chaperone hsp70, autoregulated heat shock protein	3,03	0,55	1,65
<i>hfq</i>	RNA chaperone Hfq	2,11	-	-
<i>hscA</i>	chaperone protein HscA	1,44	-	-
<i>hscB</i>	co-chaperone protein HscB	1,63	-	-1,89
<i>hslO</i>	Heat shock protein Hsp33	2,34	-0,40	1,94
<i>hslR</i>	Heat shock protein	1,94	-0,44	2,61
<i>htpG</i>	Chaperone protein HtpG	3,07	-	1,62
<i>ibpA</i>	Heat shock chaperone	5,42	1,33	1,90
<i>ibpB</i>	Heat shock chaperone	4,29	-0,75	2,26
<i>pspA</i>	Phage shock protein A	4,32	-0,42	-0,95
<i>pspB</i>	Phage shock protein B	3,93	-0,40	-1,45
<i>pspC</i>	Phage shock protein C	3,59	-0,76	-0,88
<i>pspD</i>	Phage shock protein D	2,80	-	-1,21
<i>uspG1</i>	Universal stress protein G	-1,04	2,17	-
<i>uspG2</i>	Universal stress protein G	-	2,15	-
<i>uspA</i>	Universal stress protein	-1,48	2,10	-
<i>groEL</i>	60 kDa chaperonin		2,65	0,53
Response to oxidative stress and reductase				
<i>katE</i>	Catalase	-1,72	1,89	-1,94
<i>osmY1</i>	Putative lipoprotein	-1,50	1,23	-2,95
<i>sodA</i>	Superoxide dismutase	-	-4,23	-
<i>sodB</i>	Superoxide dismutase	-	3,99	-
<i>cbiJ</i>	Cobalt-precorrin-6a reductase	-	2,06	-
<i>cysH</i>	phosphoadenosine phosphosulfate reductase	-	1,48	3,41
<i>dmsC</i>	Anaerobic dimethyl sulfoxide reductase, C subunit	-1,88	2,95	-
<i>ghrA</i>	Hydroxypyruvate reductase	-	1,38	0,49
<i>metF</i>	methylenetetrahydrofolate reductase (NAD(P)H)	0,87	1,75	1,52
<i>nemA2</i>	NADH:flavin oxidoreductase	0,75	1,15	1,50
<i>nrdA</i>	Ribonucleoside-diphosphate reductase	-0,82	1,54	-
<i>nrdG</i>	Anaerobic ribonucleoside-TP reductase activating protein	-1,45	2,01	0,79
<i>torD1</i>	Putative oxidoreductase component	-1,39	1,41	-
<i>grdB</i>	Glycine reductase complex component B	-	1,20	-

(1) Expression ratio was calculated by comparing the stressed condition against a reference condition (adjusted p-value<0.05) in which microorganisms were kept in a minimal media (MRD) other things being equal. White cell: up-regulated ; Black cell: down-regulated ;

		Log ₂ expression ratio ⁽¹⁾		
Gene	Product	G-like stress	D-like stress	Combined stress
TCA				
<i>acnA</i>	aconitate hydratase	-0,62	0,29	-
<i>acnB</i>	aconitate hydratase 2	-1,18	1,40	-2,16
<i>frdA</i>	fumarate reductase flavoprotein subunit	-0,64	-	1,62
<i>frdB</i>	fumarate reductase iron-sulfur subunit	-1,18	-	0,73
<i>frdC</i>	fumarate reductase subunit C	-1,54	-	
<i>gltA</i>	citrate synthase	-1,42	0,60	-4,97
<i>mdh</i>	malate dehydrogenase	-1,72	0,95	-1,52
<i>sdhA</i>	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	-0,89	-	-
<i>sdhB</i>	succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit	-1,85	-	-
<i>sucA</i>	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component	-1,53	1,92	-1,42
<i>sucB</i>	2-oxoglutarate dehydrogenase E2 component	-2,59	-	-1,23
<i>sucC</i>	succinyl-CoA synthetase beta subunit	-3,51	-	-
<i>sucD</i>	succinyl-CoA synthetase alpha subunit	-3,46	-	-
Glycolyse				
<i>acs</i>	acetyl-CoA synthetase	-1,23	0,56	-2,79
<i>fba</i>	fructose-bisphosphate aldolase. class II	-1,09	0,76	-1,16
<i>fbaB</i>	fructose-bisphosphate aldolase. class I	-2,18	1,44	-2,14
<i>fbp</i>	fructose-1.6-bisphosphatase I	-1,49	1,37	-1,10
<i>glpX</i>	fructose-1.6-bisphosphatase II	-0,40	-	1,01
<i>gpmI</i>	2.3-bisphosphoglycerate	-1,02	1,33	0,35
<i>pfkB</i>	6-phosphofructokinase 2	-0,34	1,15	-0,56
<i>pgi</i>	glucose-6-phosphate isomerase	-1,18	1,11	-0,98
<i>pgk</i>	phosphoglycerate kinase	-0,73	0,41	-1,04
<i>pgm</i>	phosphoglucomutase	-0,59	1,23	0,86
<i>tpiA</i>	triosephosphate isomerase (TIM)	-1,25	1,17	-
Oxydative phosphorylation				
<i>atpA</i>	ATP synthase subunit alpha	-0,51	-	-
<i>atpB</i>	ATP synthase subunit a	-0,52	-	-
<i>atpE</i>	ATP synthase subunit c	-0,66	-	-
<i>atpH</i>	ATP synthase	-0,41	-	-
<i>atpI</i>	ATP synthase F0, I subunit	-0,98	-	-
<i>cydA1</i>	Cytochrome D ubiquinol oxidase subunit I	-	1,79	-
<i>cydB</i>	Cytochrome D ubiquinol oxidase subunit II	-1,22	2,48	-
<i>cyoB</i>	Cytochrome o ubiquinol oxidase subunit I	-2,24	2,64	-
<i>cyoC</i>	Cytochrome o ubiquinol oxidase, subunit III	-2,39	-	-2,39
<i>cyoD</i>	Cytochrome o ubiquinol oxidase subunit IV	-2,69	-	-2,25
<i>cyoE</i>	Protoheme IX farnesyltransferase	-2,44	-	-1,68
<i>nuoC</i>	NADH:ubiquinone oxidoreductase, chain C,D	-0,66	1,62	-
<i>nuoE</i>	NADH dehydrogenase I chain E	-0,74	-	-
<i>nuoF</i>	NADH:ubiquinone oxidoreductase, chain F	-0,60	-	-
<i>nuoG</i>	NADH-quinone oxidoreductase	-0,53	-	-
<i>nuoH</i>	NADH:ubiquinone oxidoreductase, membrane subunit H	-0,49	-	-
<i>nuoJ</i>	NADH dehydrogenase I chain J	-	1,20	-0,42
<i>nuoK</i>	NADH:ubiquinone oxidoreductase, membrane subunit K	-0,96	1,34	-
<i>nuoL</i>	NADH dehydrogenase I chain L	-	1,52	-
<i>nuoM</i>	NADH:ubiquinone oxidoreductase, membrane subunit M	-	1,97	-
<i>nuoN</i>	NADH:ubiquinone oxidoreductase, membrane subunit N	-1,44	2,08	0,73

(1) Expression ratio was calculated by comparing the stressed condition against a reference condition (adjusted p-value<0.05) in which microorganisms were kept in a minimal media (MRD) other things being equal. White cell: up-regulated ; Black cell: down-regulated ;

Gene	Product	Log ₂ expression ratio ⁽¹⁾		
		G-like stress	D-like stress	Combined stress
Hydrogenases				
hyfF	Hydrogenase-4 component F	2,61	-	-
hyfG	Hydrogenase-4 component G	1,02	-	-
hybO	Hydrogenase-2 small chain	-2,12	-	2,74
hybA	Hydrogenase-2 operon protein HybA	-3,19	-	1,96
hybB	Ni/Fe-hydrogenase 2 B-type cytochrome subunit	-3,70	-	
fdhE	Formate dehydrogenase formation protein	-1,83	0,76	-0,99
fdol	Formate dehydrogenase, cytochrome b556 protein	-2,13	-	-1,69
hybC	Hydrogenase-2 large chain	-3,48	-	-
hybD	Hydrogenase expression/formation protein	-1,87	-	-
hypB	Hydrogenase nickel incorporation protein	-1,75	-	-
hypC	Putative hydrogenase formation protein	-2,16	-	-
hycE	Formate hydrogenlyase, subunit E	1,29	-	0,99
Formate dehydrogenase				
fdoG	Aerobic formate dehydrogenase, alpha subunit	-1,05	1,98	-2,36
fdoH	Formate dehydrogenase-O, iron-sulfur subunit	-1,67	-	-
fdoG	Formate dehydrogenase-O, selenocysteine-containing	-1,72	2,05	-
fdol	Formate dehydrogenase, cytochrome b556 protein	-2,13	-	-1,69
Glutamate/GABA metabolism				
gadB	Glutamate decarboxylase beta	2,84	-	1,02
aspB	Glutamate synthase [NADPH] large chain	0,57	0,95	-
aspB	Glutamate synthase [NADPH] small chain.	0,57	0,95	-
gdhA	Glutamate dehydrogenase	-0,68	-0,65	-
gabT	4-aminobutyrate aminotransferase, PLP-dependent	-1,27	-3,47	-
arg	Carbamoyl-phosphate synthase, large subunit	-0,84	-	-
carA	Carbamoyl-phosphate synthase, small subunit	-3,11	-	2,24
glmS	L-glutamine:D-fructose-6-phosphate aminotransferase	-0,36	1,44	1,58
Decarboxylase				
adi	arginine decarboxylase	1,35	-0,38	-1,96
Sulfur metabolism and transport				
cysA	sulfate/thiosulfate import ATP-binding protein cysA	4,20	-	-
cysP	thiosulfate-binding protein	6,47	-	-
cysU	sulfate transport system permease protein cysT	5,75	-	-
cysW	sulfate transport system permease protein cysW	5,42	-	-
cysC	adenylyl-sulfate kinase	4,41	-	2,61
cysD	sulfate adenylyltransferase subunit 2	7,07	-	-
cysI	sulfite reductase [NADPH] flavoprotein alpha-component	2,81	1,33	-
cysJ	sulfite reductase [NADPH] flavoprotein alpha-component	4,05	0,72	-
cysN	sulfate adenylyltransferase subunit 1	5,06	-	-
iscS	cysteine desulfurase	1,85	-	-1,43
sbp	sulfate-binding protein	4,09	-	-
Nitrate metabolism				
narK	Nitrite extrusion protein (MFS-family transporter)	1,68	-	-0,93
narH	Nitrate reductase 1, beta subunit	1,41	-	-
narG	Respiratory nitrate reductase 1 alpha chain	0,91	-	

(1) Expression ratio was calculated by comparing the stressed condition against a reference condition (adjusted p-value<0.05) in which microorganisms were kept in a minimal media (MRD) other things being equal. White cell: up-regulated ; Black cell: down-regulated ; “-” no significant differential expression

		Log ₂ expression ratio ⁽¹⁾		
Gene	Product	G-like stress	D-like stress	Combined stress
Transporter (ABC, PTS, Others)				
	ABC transporter, substrate-binding component	7,25	-	-
	ABC transporter, inner membrane subunit	6,17	0,66	2,36
	ABC transporter, inner membrane subunit	4,00	0,77	1,79
malX	PTS system, maltose and glucose-specific Iabc component	2,07	-	3,99
fliY	Putative amino-acid ABC transporter	4,85	-	1,29
	Sigma-54 dependent transcriptional regulator/ABC transporter	2,77	-	-
yecS	Extracellular solute-binding protein-amino acid abc transporter	2,86	-2,14	-
H ⁺ co-transport				
kdpA	P-type ATPase, high-affinity potassium transport system, A chain	1,82	-	2,99
kdpB	Putative potassium-transporting ATPase B chain	2,79	-	2,09
kdpC	K ⁺ -transporting ATPase, C subunit	1,82	-	-
trkA	Potassium uptake protein	-0,43	-	-1,09
trkH	Trk system potassium uptake protein TrkH	-0,85	-	-
mgtB	Magnesium transport ATPase	2,53	-	1,84
mgtC1	Mg2 ⁺ transport ATPase	4,41	-	2,64
sapB	Putative membrane protein	0,53	-0,87	-2,31
Efflux pumps / Porines				
emrB	multidrug resistance protein B	0,87	2,35	2,59
tolC	Outer membrane protein TolC	-1,11	1,32	-
acrA	Acriflavin resistance protein A	-0,36	0,56	0,34
acrD	putative aminoglycoside efflux pump	2,36	-0,75	-1,60
sdeY	Multidrug resistance efflux pump	-	1,39	0,39
ybhR	ABC-type multidrug transport system, permease component	1,39	1,16	0,62
mdlB	Multidrug ABC transporter, permease/ATP-binding protein	-	1,02	1,61
ompH	Cationic 19 kDa outer membrane protein	-	1,40	1,40
mdlB	Outer membrane pore protein N, non-specific	-	1,02	1,61
ompA2	Putative exported protein	1,28	1,24	-
galF	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase, GalF protein	-	1,37	-
meoA	Outer membrane protein C, porin	-1,91	1,85	-2,39

(1) Expression ratio was calculated by comparing the stressed condition against a reference condition (adjusted p-value<0.05) in which microorganisms were kept in a minimal media (MRD) other things being equal. White cell: up-regulated ; Black cell: down-regulated ;

		Log ₂ expression ratio ⁽¹⁾		
Gene	Product	G-like stress	D-like stress	Combined stress
Translation/ Traduction				
<i>rrmJ</i>	Ribosomal RNA large subunit methyltransferase J	2,49	-0,50	-
<i>rpsQ</i>	30S ribosomal protein S17	1,80	-	2,60
<i>rpsS</i>	30S ribosomal protein S19	1,72	-	4,96
<i>rpsF</i>	30S ribosomal protein S6	-	2,03	4,96
<i>rpsJ</i>	30s ribosomal subunit protein s10	0,96	2,07	6,37
<i>rpsR</i>	30s ribosomal subunit protein s18	-	2,41	4,85
<i>rpsC</i>	30S ribosomal subunit protein S3	1,77	-	3,96
<i>rplP</i>	50S ribosomal protein L16	1,85	-	3,63
<i>rplS</i>	50S ribosomal protein L19	1,74	-	3,39
<i>rplB</i>	50S ribosomal protein l2	1,74	-	5,29
<i>rpmC</i>	50S ribosomal protein L29	1,82	-	3,64
<i>rplC</i>	50S ribosomal protein L3	1,15	2,41	6,40
<i>rpmE</i>	50S ribosomal protein L31	1,80	1,55	2,12
<i>rplE</i>	50S ribosomal protein L5	-	1,70	2,11
<i>rplD</i>	50S ribosomal subunit protein L4	1,39	2,64	6,21
<i>rplI</i>	50S ribosomal subunit protein L9	-	2,64	3,83
<i>fmt</i>	Methionyl-tRNA formyltransferase	-1,08	-1,24	0,33
<i>yibK</i>	Predicted rRNA methylase	-0,63	-1,73	1,16
<i>rluA</i>	Ribosomal large subunit pseudouridine synthase A	1,07	2,58	-
<i>rplA</i>	Ribosomal protein L1	-	1,90	-
<i>rpsN</i>	Ribosomal protein S14p	-	1,80	-
<i>yheL</i>	Ribosomal RNA large subunit methyltransferase J	2,21	-0,93	-
<i>rpoD</i>	RNA chaperone Hfq	2,03	-0,59	-
<i>trmD</i>	RNA polymerase sigma factor	1,65	1,20	-
<i>luxS</i>	S-ribosylhomocysteine lyase	1,62	-	-
<i>rpoC</i>	tRNA (guanine-N(1)-)-methyltransferase	1,60	-	1,31
DNA synthetis and reparation				
<i>mutM</i>	DNA glycosylase	4,11	-0,43	1,89
<i>dnaG</i>	DNA primase	3,07	-	-
<i>topA</i>	DNA topoisomerase	1,81	-	1,89
<i>hupB</i>	DNA-binding protein HU-beta	-1,04	-	2,58
<i>dnaQ</i>	DNA polymerase III subunit epsilon	-1,05	-0,86	0,94
<i>tus</i>	Inhibitor of replication at Ter, DNA-binding protein	-1,14	-	-1,67
<i>Dps</i>	DNA-binding protein	-0,45	0,87	-3,13
<i>holE</i>	DNA polymerase III theta subunit	-1,32	0,60	-0,62
<i>ogt</i>	methylated-DNA--protein-cysteine methyltransferase	-1,34	-0,57	0,55
<i>comEA</i>	DNA uptake protein	-1,46	0,66	-0,95
<i>rpoA</i>	DNA-directed RNA polymerase, alpha subunit	0,74	1,55	2,93
<i>recO</i>	DNA repair protein RecO	0,49	-1,17	-
<i>dinJ</i>	DNA-damage-inducible protein J	0,51	-1,21	-1,48
<i>yrdD</i>	Putative DNA topoisomerase	-	-1,29	-2,37

(1) Expression ratio was calculated by comparing the stressed condition against a reference condition (adjusted p-value<0.05) in which microorganisms were kept in a minimal media (MRD) other things being equal. White cell: up-regulated ; Black cell: down-regulated ;

The metabolism of amino acids appeared to be of importance in both bacteria. Decarboxylation of amino acids to help bacteria fight against acid stress has been nicely described in the literature, especially in the *Enterobacteriaceae* family (for review see Krulwich et al. 2001). A focus on the glutamate metabolism (Figure 4) show that *H. alvei* GB001 up-regulated the L-Glutamate conversion to GABA while down-regulating the other pathways involving glutamate as a substrate. It is of note that the gene encoding the GadC transporter (exporting GABA while importing Glutamate) was not found in the annotated genome of *H. alvei* GB001 and might be explained by the poor composition of the stress medium. Indeed, if no extra-cellular glutamate is available to import, the cell shall not waste its GABA pool and last molecule could be used in other part of the microorganism metabolism. The arginine decarboxylase encoding gene, *adi*, along with *fliY* and *yecS* encoding two amino acids transporters were up-regulated as well, which add some more proof of the ability of *H. alvei* GB001 to use decarboxylation of amino acid to increase its internal pH. Decarboxylation of amino acid was up-regulated as well in *S. equorum* Mu2 with the over-expression of a putative lysine/arginine/ornithine decarboxylase encoding gene (*unamed*). Such phenomenon has been documented in gram-positive bacteria like *Lactococcus lactis* (Cotter et al. 2003). We also observed the up-regulation of genes *potAD* involved in polyamines metabolism in *S. equorum* Mu2. In agreement with this, spermidine and putrescine have been identified as agent regulating pH homeostasis among other functions in the bacterial cell (Pegg and Casero, 2009).

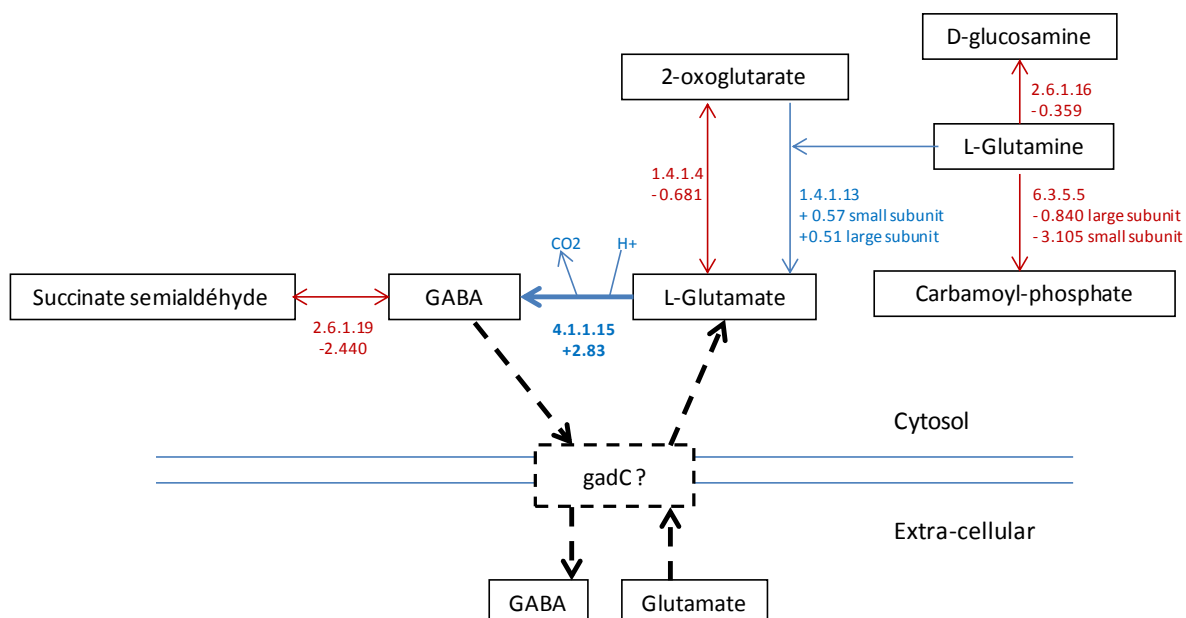


Figure 4 : Glutamate metabolism and conversion to GABA. Blue:Up-regulated genes. Red:down-regulated genes 1.4.1.13, glutamate synthase (NADPH) ; 1.4.1.4, glutamate dehydrogenase (NADP+) ; 2.6.1.16, glutamine-fructose-6-phosphate transaminase (isomerizing) ; 2.6.1.19, 4-aminobutyrate-2-oxoglutarate transaminase ; 6.3.5.5, Carbamoyl-phosphate synthase (glutamine-hydrolysing) ; 4.1.1.15, Glutamate decarboxylase A

Table 5: Selection of genes (CDS) significantly up- or down-regulated in *S. equorum* Mu2 after exposure to (i) G-like, (ii) D-like and (iii) G-like followed by D-like – i.e. combined- stress

Gene	Product	Log ₂ expression ratio ⁽¹⁾		
		G-like stress	D-like stress	Combined stress
General stress proteins				
	universal stress family domain-containing protein	7,09	-1,57	1,60
<i>hsI</i> O	33 kDa chaperonin	-	1,61	-
<i>asp23</i>	alkaline shock protein 23	3,43	-1,51	-
<i>clpC</i>	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit	-	3,63	-
<i>clpX</i>	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX	-2,74	3,63	1,81
<i>clpP</i>	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit ClpP	-	4,20	-
<i>clpB</i>	chaperone protein ClpB	-	4,52	-2,04
<i>dnaJ</i>	chaperone protein DnaJ	-	2,05	-1,46
<i>dnaK</i>	chaperone protein DnaK	-	1,81	-1,40
<i>groEL</i>	chaperonin GroEL	-1,79	3,33	-1,04
<i>groES</i>	co-chaperonin GroES	-2,10	3,69	-
<i>cspA</i>	cold shock protein CspA	4,36	-0,69	1,54
	general stress protein	3,76	-1,18	0,72
<i>hfq</i>	RNA chaperone Hfq	1,00	-	1,80
	universal stress protein	6,12	-3,63	-
Reductase / oxidoreductase				
<i>panE</i>	2-dehydropantoate 2-reductase	4,02	-0,58	-1,39
	aldehyde dehydrogenase	2,06	1,54	-
<i>arsC</i>	arsenate reductase	1,26	2,08	-1,15
<i>cdr</i>	coenzyme A disulfide reductase	2,41	0,71	0,97
<i>guaC</i>	GMP reductase	-	1,97	-
<i>hisD</i>	histidinol dehydrogenase	2,64	-1,90	-
<i>guaB</i>	IMP dehydrogenase	2,11	-1,98	-
<i>mdh</i>	malate dehydrogenase	2,49	0,37	-
<i>mgo</i>	malate dehydrogenase (acceptor)	3,09	-0,84	-
	malate dehydrogenase (oxaloacetate-decarboxylating)	1,71	1,27	-1,35
<i>nfrA</i>	NADPH-dependent oxidoreductase	5,75	-2,85	-
	nitroreductase family protein	4,06	-0,38	1,21
<i>msrA</i>	peptide-methionine (S)-S-oxide reductase	2,17	-0,48	1,66
<i>putA</i>	proline dehydrogenase	2,85	-0,35	-
<i>dkgA</i>	putative 2,5-didehydrogluconate reductase	1,52	1,72	0,68
	putative arsenate reductase	1,63	-1,42	1,28
	putative oxidoreductase	2,74	-	-
	putative thioredoxin reductase	-1,18	2,47	-
	putative Zn-dependent alcohol dehydrogenase	1,80	-3,18	-0,89
	pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase	3,47	-3,93	-
	short-chain dehydrogenases/reductases family protein	3,91	7,06	0,92
	short-chain dehydrogenases/reductases family protein	3,91	7,06	0,92
	short-chain dehydrogenases/reductases family protein	2,20	7,82	0,92
	short-chain dehydrogenases/reductases family protein	1,82	7,06	0,89
	short-chain dehydrogenases/reductases family protein	1,79	2,19	0,90
Response to oxidative stress				
<i>sodA</i>	superoxide dismutase	1,89	-	-

(1) Expression ratio was calculated by comparing the stressed condition against a reference condition (adjusted p-value<0.05) in which microorganisms were kept in a minimal media (MRD) other things being equal. White cell: up-regulated ; Black cell: down-regulated ; “-“ no significant differential expression

		Log ₂ expression ratio ⁽¹⁾		
Gene	Product	G-like stress	D-like stress	Combined stress
Oxydative phosphorylation				
<i>ubiE</i>	demethylmenaquinone methyltransferase	-0,89	-	-
<i>atpA</i>	H(+)-transporting two-sector ATPase, alpha chain	-3,56	0,79	-
<i>atpD</i>	H(+)-transporting two-sector ATPase, beta chain	-3,38	0,62	-
<i>atpE</i>	H(+)-transporting two-sector ATPase, chain C	-4,00	-	-0,97
<i>atpH</i>	H(+)-transporting two-sector ATPase, delta chain fragment	-3,88	0,60	-
<i>atpH</i>	H(+)-transporting two-sector ATPase, delta chain fragment	-3,88	0,60	-
<i>atpC</i>	H(+)-transporting two-sector ATPase, epsilon chain	-4,23	0,71	-
<i>atpG</i>	H(+)-transporting two-sector ATPase, gamma chain	-3,88	0,64	-
<i>ctaA/cyoB</i>	heme A synthase	-2,41	-0,68	-
	probable NADH-quinone oxidoreductase subunit	-2,15	-	-
<i>ctaB/cyoB</i>	protoheme IX farnesyltransferase	-1,49	-0,59	-
<i>qoxB</i>	quinol oxidase subunit 1	-1,68	-1,96	-
<i>qoxA</i>	quinol oxidase subunit 2	-2,24	-2,00	-
<i>sdhA</i>	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	-1,18	-	-
<i>sdhC</i>	succinate dehydrogenase, cytochrome b558 subunit	-1,16	-0,64	-
TCA Cycle				
<i>lpdA</i>	dihydrolipoyl dehydrogenase	-1,46	1,45	-
<i>pdhC</i>	dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase	-2,31	1,55	-
<i>pyc</i>	pyruvate carboxylase	-1,72	0,44	1,23
<i>pdhA</i>	pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	-2,24	1,43	-
<i>pdhB</i>	pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta	-2,24	1,58	-
<i>sdhA</i>	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	-1,18	-	-
<i>sdhC</i>	succinate dehydrogenase, cytochrome b558 subunit	-1,16	-0,64	-
<i>sucD</i>	succinyl-CoA synthetase (ADP-forming) alpha subunit	-1,88	-0,48	-
<i>sucC</i>	succinyl-CoA synthetase beta subunit	-1,37	-0,46	-
Glycolyse				
<i>acs</i>	acetyl-CoA synthetase	-1,56	-	-
<i>galM</i>	aldose 1-epimerase	-0,76	-	-
<i>pckA</i>	phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)	-2,51	-0,98	-1,67
<i>pdhA</i>	pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	-2,24	1,43	-
<i>pdhB</i>	pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta	-2,24	1,58	-
<i>pdhC</i>	pyruvate dehydrogenase E2 component	-2,31	1,55	-
<i>pdhD</i>	dihydrolipoamide dehydrogenase	-1,46	-	-
Amino acid decarboxylases				
	putative lysine decarboxylase fragment	1,77	0,53	-
	arginine/lysine/ornithine decarboxylase	1,15	-	-
Polyamines				
	spermidine/putrescine ABC transporter, inner membrane subunit	2,30	-2,80	-
<i>potD</i>	spermidine/putrescine ABC transporter, substrate-binding protein	2,24	-2,72	0,95
<i>potA</i>	spermidine/putrescine ABC transporter, ATP-binding subunit	2,01	-	-1,67
Sulfur metabolism				
<i>cysK</i>	putative cysteine desulfurase	-	1,77	0,97
	cysteine synthase	-	1,28	-1,66
	putative iron-sulfur cluster assembly accessory protein	-1,11	1,83	1,28

(1) Expression ratio was calculated by comparing the stressed condition against a reference condition (adjusted p-value<0.05) in which microorganisms were kept in a minimal media (MRD) other things being equal. White cell: up-regulated ; Black cell: down-regulated ; “-“ no significant differential expression

		Log ₂ expression ratio ⁽¹⁾		
Gene	Product	G-like stress	D-like stress	Combined stress
Transporter (ABC, PTS, other)				
	ABC transporter, ATP-binding subunit	4,41	2,38	-1,12
	ABC transporter, inner membrane and binding protein subunit	1,73	-	-1,38
	ABC transporter, inner membrane subunit	5,34	2,42	-0,95
	amino acid ABC transporter, binding protein subunit	1,99	-	-1,93
	amino acid ABC transporter, inner membrane subunit	1,40	-	-1,69
	amino acid transporter	1,89	0,48	1,36
	BCCT family osmoprotectant transporter	-	2,01	-
gluA	glutamate ABC transporter, ATP-binding subunit GluA	2,06	-	-
	iron-siderophore ABC transporter, ATP-binding subunit	1,77	0,90	0,84
	iron-siderophore ABC transporter, substrate-binding protein	2,26	0,85	-0,48
metN	methionine ABC transporter, ATP-binding subunit MetN	1,82	-	-
	MFS superfamily transporter	1,73	3,23	-1,71
	glycine/carnitine/choline/L-proline ABC transporter	-1,84	1,94	1,03
	polar amino acid ABC transporter, ATP-binding subunit	1,47	0,84	-1,53
	possible betaine/carnitine/choline transporter	2,26	-2,93	-
	putative ABC transporter component	1,84	-	-1,52
	putative nitrate/nitrite transporter	1,66	-	-1,66
	putative transporter	3,09	1,69	0,70
	RHBT family amino acid transporter	3,03	-	-1,50
rbsA	ribose ABC transporter, ATP-binding subunit	1,93	-0,90	-2,30
sdcS	sodium-dependent dicarboxylate transporter SdcS	1,83	-1,73	-
	sugar transporter fragment	1,99	-2,04	-1,39
	TRAP dicarboxylate transporter, substrate-binding component	1,75	-0,90	-1,09
Ion H ⁺ co-transport				
trkA	Trk system potassium uptake protein TrkA	2,00	0,50	-
mnhC	Na(+)/H(+) antiporter subunit C	-1,20	-0,53	-1,83
mnhB	Na(+)/H(+) antiporter subunit B	-1,48	-0,63	-1,95
mnhG	Na(+)/H(+) antiporter subunit G	-1,50	-	-0,85
mnhA	Na(+)/H(+) antiporter subunit A	-1,51	-0,66	-1,41
mnhE	Na(+)/H(+) antiporter subunit E	-1,60	-	-1,26
mnhD	Na(+)/H(+) antiporter subunit D	-1,85	-0,33	-1,61
mnhF	Na(+)/H(+) antiporter subunit F	-1,89	-	-1,16
Metal transport				
	putative heavy metal/cadmium-transporting ATPase	8,09	-1,81	-
	iron-siderophore ABC transporter, ATP-binding subunit	1,77	0,90	0,84
	iron-siderophore ABC transporter, substrate-binding protein	2,26	0,85	-0,48
	iron-siderophore ABC transporter, substrate-binding protein	2,26	0,85	-0,48
	metal ion transporter	2,42	0,47	0,95
	metal-dependent hydrolase	2,84	-1,32	1,41
modA	molybdate ABC transporter, substrate-binding protein ModA	1,61	-	-
	putative metal uptake regulation protein	5,00	-1,86	2,18
	putative metal-dependent amidase/carboxypeptidase	1,69	0,50	0,64
Multi-drug resistance transporter				
	MFS superfamily transporter	1,73	3,23	-1,71
	putative MFS superfamily transporter	-1,24	3,66	-0,92
EmrB	EmrB/QacA subfamily drug resistance transporter	-	1,74	-
	putative drug exporter of the RND superfamily	1,24	2,79	-0,82
	putative drug resistance ATP-binding protein	1,09	3,91	-
	putative EmrB/QacA subfamily drug resistance transporter	-	1,21	-1,00
	quaternary ammonium compound-resistance protein	-	4,72	-

(1) Expression ratio was calculated by comparing the stressed condition against a reference condition (adjusted p-value<0.05) in which microorganisms were kept in a minimal media (MRD) other things being equal. White cell: up-regulated ; Black cell: down-regulated ; “-“ no significant differential expression

		Log ₂ expression ratio ⁽¹⁾		
Gene	Product	G-like stress	D-like stress	Combined stress
Translation/ Traduction				
<i>prmA</i>	Ribosomal protein L11 methyltransferase	-1,24	1,96	-1,52
<i>frr</i>	ribosome-recycling factor	-1,56	1,34	0,86
<i>rimM</i>	16S rRNA-processing protein RimM	3,74	-1,08	-0,84
<i>rpsJ</i>	30S ribosomal protein S10	-2,97	2,39	
<i>rpsK</i>	30S ribosomal protein S11	-3,06	1,51	-
<i>rpsC</i>	30S ribosomal protein S3	-3,15	1,68	-1,25
<i>rpsD</i>	30S ribosomal protein S4	-3,33	3,81	-
<i>rpsE</i>	30S ribosomal protein S5	-3,33	1,53	-1,09
<i>rpsF</i>	30S ribosomal protein S6	-4,44	3,02	-
<i>rpsG</i>	30S ribosomal protein S7	-3,99	0,94	-
<i>rpsS</i>	30S ribosomal protein S19	-3,52	1,91	-1,20
<i>rpsH</i>	30S ribosomal protein S8	-3,54	1,59	-1,27
<i>rpsQ</i>	30S ribosomal protein S17	-3,55	1,51	-1,37
<i>rpsP</i>	30S ribosomal protein S16	-3,67	3,16	-
<i>rpmG</i>	50S ribosomal protein L33	-2,59	2,06	0,63
<i>rpmH</i>	50S ribosomal protein L34	-4,35	2,96	1,11
<i>rpsL</i>	30S ribosomal protein S12	-4,41	1,11	-
<i>rpmH</i>	50S ribosomal protein L34	-4,35	2,96	1,11
<i>rpmI</i>	50S ribosomal protein L35	-3,67	2,72	-
<i>rplD</i>	50S ribosomal protein L4	-3,61	2,25	-
<i>rplE</i>	50S ribosomal protein L5	-3,16	1,58	-1,30
<i>rplF</i>	50S ribosomal protein L6	-3,45	1,40	-1,17
<i>rplL</i>	50S ribosomal protein L7/L12	-4,74	1,95	-
<i>argS</i>	arginine--tRNA ligase	-1,96	-	-
<i>gatA</i>	aspartyl/glutamyl-tRNA amidotransferase subunit A	-2,78	2,47	0,76
<i>gatB</i>	aspartyl/glutamyl-tRNA amidotransferase subunit B	-3,01	2,44	0,68
<i>rpoA</i>	DNA-directed RNA polymerase alpha chain	-3,16	1,55	-
<i>glyQS</i>	glycine--tRNA ligase	-3,35	-0,51	-
<i>ileS</i>	isoleucine-tRNA ligase	-1,89	0,82	-1,24
<i>trmFO</i>	methyltransferase	-2,05	2,04	-
<i>tgt</i>	queueine tRNA-ribosyltransferase	-3,43	1,84	1,28
<i>rlmN</i>	ribosomal RNA large subunit methyltransferase N	-1,59	0,83	-
<i>queA</i>	S-adenosylmethionine:tRNA ribosyltransferase-isomerase	-2,43	1,19	-
<i>trmD</i>	tRNA (guanine-N(1)-)-methyltransferase	3,32	-0,49	-0,75
<i>miaA</i>	tRNA isopentenyltransferase fragment	1,86	0,65	1,17
<i>trpS</i>	tryptophan--tRNA ligase	1,62	0,90	1,16
DNA synthethis and repair				
<i>recA</i>	RecA bacterial DNA recombination protein	2,74	1,39	0,87
	ImpB/MucB/SamB family DNA-damage repair protein	2,68	-	-0,64
<i>mutY</i>	putative A/G-specific DNA glycosylase	2,01	0,35	-0,54
<i>dnal</i>	primosomal protein Dnal	1,99	0,25	-
<i>mutL</i>	DNA mismatch repair protein MutL	-1,20	-	-1,04
<i>pcrA</i>	ATP-dependent DNA helicase PcrA	-1,20	2,08	-0,82
<i>recO</i>	DNA repair protein RecO	-1,26	1,70	1,31
<i>mutS</i>	DNA mismatch repair protein MutS	-1,26	0,73	-
<i>dnaB</i>	replicative DNA helicase	-1,43	1,85	0,91
<i>nth</i>	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase	-1,49	2,00	0,44
<i>ruvB</i>	Holliday junction ATP-dependent DNA helicase RuvB	-1,72	0,84	-0,39
<i>ruvA</i>	Holliday junction ATP-dependent DNA helicase RuvA	-2,20	0,45	-
	DNA topoisomerase	1,22	1,17	0,91
<i>recG</i>	ATP-dependent DNA helicase RecG	-2,36	0,89	-
<i>rpoA</i>	DNA-directed RNA polymerase alpha chain	-3,16	1,55	-
<i>hup</i>	DNA-binding protein HU	-3,24	-1,58	

(1) Expression ratio was calculated by comparing the stressed condition against a reference condition (adjusted p-value<0.05) in which microorganisms were kept in a minimal media (MRD) other things being equal. White cell: up-regulated ; Black cell: down-regulated ; “-” no significant differential expression

A detailed observation of *H. alvei* GB001 sulfur metabolism (Table 4) showed a clear up-regulation of the genes *cysND*, *cysC* and *cysJ* respectively coding for a transferase, a kinase and a reductase which are involved in the conversion of sulfate into sulfide. These enzymes allow the conversion of a +6 oxidation state molecule (sulfate) to a -2 oxidation state molecule (sulfide). Aside from the putative role of the sulfide molecule itself, the reduction process is H (+) dependent and is likely to contribute to decrease the intracellular concentration of protons in the intracellular compartment of *H. alvei*. Genes involved in the sulfate uptake are up-regulated as well (*cysA*, *cysT* and *cysW* respectively coding for an ATP-binding protein and two permeases). It has been documented that acidophilic organisms can use sulfur as an energy source (Johnson et al., 2008). Based on the convergent up-regulation of both metabolism and sulfur uptake, it would appear that sulfur is a core molecule in *H. alvei* GB001 ability to withstand gastric stress and should be further investigated. To pursue with *H. alvei*'s metabolism that can be linked to reduction of molecules, the genes involved in nitrate metabolism were up-regulated, namely *narH* and *narK* coding respectively for a nitrate reductase and a nitrite extrusion protein; both participate to the reduction of a nitrogen source and the same hypothesis can be drawn regarding the link between reduction and H(+) consumption as in the sulfur metabolism.

In *S. equorum* Mu2, genes encoding reductases and dehydrogenases, e.g. *mdh* and *mgo* encoding malate dehydrogenases, were up-regulated. These families of enzymes are thus possibly involved in pH homeostasis in this bacterium. Indeed, dehydrogenases are very often NAD⁺ dependent and take one proton to complete their dehydrogenation. Oxidized coenzymes need to be subsequently reduced which might explain the co-functioning of hydrogenases and reductases during gastric stress. In addition, still in *S. equorum* Mu2, *sodA*, encoding superoxide dismutase A, was up-regulated in case of gastric challenge, which participated to reduce the oxidative consequences of that stress. In the case of *H. alvei* GB001, the hydrogenases complexes drew our attention. These enzymes, widely described among gram-negative bacteria (Noguchi et al. 2010), give the ability to either produce or degrade dihydrogen. The Hyd-1, Hyd-2, Hyd-3 and Hyd-4 complexes, have been described to use dihydrogen and produce H(+) and CO₂ and, conversely, this being linked to the aeration conditions (Hayes et al. 2006, Noguchi et al. 2010). Part of the genes coding for these complexes are either up- (*hyfFG*) or down-regulated (*hybABCO*, *hypBCD*). Therefore, we will need to further investigate which groups of genes are involved in the formation of which hydrogenase complex in order to draw hypothesis about the role of this family of enzymes in the resistance of *H. alvei* to gastric stress. Moreover, formate metabolism, especially formate dehydrogenase, is linked to Hyd-n complexes (Noguchi et al. 2010). Still in *H. alvei* GB001, The down-regulation of *fdoGHI* genes coding for such enzymes might be linked to intracellular pH regulation as well.

Regarding membrane transport, numerous transporters were heavily up-regulated in both bacteria, thus indicating that the cell is actively exchanging with its environment. As an example, the transport of cation is up-regulated in *H. alvei* GB001. Indeed, P-type ATPase *kdp* (transporting potassium) and *mgt* (transporting magnesium), respectively encoded by *kdpABC* and *mgtBC1* genes were up-regulated in gastric-like conditions (Moller et al 1996). However P-type ATPase are not reported to be able to transport H(+) (Gunzel et al. 2006); their significant up-regulation might indicate that *H. alvei* GB001 would be able to use them to export H(+) in case of acid stress. In *S. equorum* Mu2, a sodium/H(+) antiporter (*mnhABCDEF*) was clearly down-regulated. This might indicate that the mhn complex is involved in H(+) uptake. Genes involved in metal transport, such as *mgtBC1* encoding a magnesium transporter in *H. alvei* GB001 and an “unidentified” gene encoding an iron transporter in *S. equorum* Mu2, were up-regulated as well. To finish with the two bacteria’s transcriptional response to gastric-like stress, DNA synthesis seemed to be put on hold, except for reparation purposes. Indeed, the gene *mutM* encoding the DNA glycosylase was up-regulated in *H. alvei* GB001. This enzyme is involved in the prevention of mutations (Tajiri et al. 2005). Alongside, genes coding for DNA repair proteins (e.g. *recO* and *dinJ*) were up-regulated as well. A comparable phenomenon was observed in *S. equorum* Mu2: a gene encoding DNA bacterial recombination protein (*recA*) was up-regulated, which has already been documented for gram-positive bacteria like *Streptococcus mutans* (Cotter et al. 2003).

As for translation processes, responses were dramatically different for both bacteria. In the case of *H. alvei* GB001, ribosomal encoding genes (e.g. *rps*, *rpm* and *rpl* families) along with tRNA encoding genes (e.g. *ropC*, *hfq*) were up-regulated. This corroborates the fact that cells synthesized proteins and were therefore able to maintain a basal metabolic activity to fight against gastric-like stress. On the contrary, translation was dramatically down-regulated in *S. equorum* Mu2. Indeed, almost all genes encoding ribosomal proteins were repressed. That phenomenon indicates the cells were heavily struggling to maintain their basal activity and enzymes pool. The high mortality of *S. equorum* Mu2 when exposed to gastric challenge (loss of 3 log CFU/mL) corroborates this finding.

3.3.3. Duodenal-like stress response

Figure 2 (B) and Figure 3(B) show the number of up- and down-regulated genes per functional categories for *H. alvei* GB001 and *S. equorum* Mu2, respectively, after the duodenal-like challenge compared to controls.

Following exposure to duodenal-like stress, genes coding for general stress proteins are induced as observed for gastric-like stress. For instance, a gene coding for the GroEL chaperon was up-regulated for both bacteria, the Universal Stress Protein family (i.e. *uspAG₁G₂* encoding genes) was over-expressed in *H. alvei* GB001 and the *dnaKJ* chaperons encoding genes were up-regulated in *S.*

equorum Mu2, which was not the case when this bacteria was exposed to a gastric challenge (Table 4 and Table 5). Both bacteria seemed to actively fight oxidative stress. Indeed, the superoxide dismutase A encoding gene (*sodA*) was up-regulated in *S. equorum* Mu2, along with genes encoding for “short-chain dehydrogenases/reductases family proteins”. In the case of *H. alvei* GB001, genes encoding for catalase (*katE*) and superoxide dismutase (SOD) B (*sodB*) were highly up-regulated which indicates a strong response to oxidative stress (Farr and Kogoma, 1991). It is to note that the other SOD (*sodA*) is down-regulated even though we could have hypothesized it should be up-regulated as well. However, the SOD A enzyme is manganese dependent, whereas SOD B is iron dependent. The relative abundance of metals might explain the difference in expression regulation of these two genes. Table 4 displays other up-regulated genes encoding reductases, which further account for a strong struggle of *H. alvei* GB001 against oxidative stress.

Specific to *S. equorum* Mu2, TCA cycle and oxidative phosphorylation coding genes were mostly unchanged or up-regulated which indicates the cell was still using a basal aerobic metabolism. Sulfur metabolism encoding genes are up-regulated (e.g. *cysK* encoding a cysteine synthase). Genes involved in membrane transport and, more specifically, those encoding the multidrug resistance transporters (MDR), were heavily up-regulated in both *H. alvei* GB001 and *S. equorum* Mu2. Indeed, we found out the ubiquitous transporters “Major Facilitator Superfamily” (MFS) – a sub family of the MDR transporters - were up-regulated in *S. equorum* Mu2. The MFS transporters have been reported to be able to carry, in and out of the cell, a wide span of molecules (Pao, et al 1998) including bile salts (Begley et al. 2005). Moreover, genes encoding efflux pump belonging to this MDR family, such as *emrB/qacA*, *tolC* or *ompHA2* were up-regulated in both bacteria. Such family of proteins has proved to be involved in the transport of cationic detergent (Buffet-Bataillon et al. 2012). Conjugated bile salts are often charged strong acid and could be related to “cationic molecules” and possibly be exported by EmrB/QacA complexes. Since bile salt have been reported to be strongly oxidant and capable of passively diffusing through the cytoplasmic membrane when non-conjugated (Heuman et al. 1996), the up-regulation of such MDR would be interesting to further investigate. Additionally, the viability of the two bacteria was not affected by exposition to duodenal stress which confirms what is shown by the transcriptomic response. Begley’s et al. work (2005) spotted that *Enterobacteriaceae* are considered to be very bile resistant because they are commonly isolated from the gallbladder and bile of mammals. Therefore, *H. alvei* GB001 being strongly resistant to bile acid would not be surprising. However, *S. equorum* Mu2 resistance was not hypothesized. It is therefore new information, since no result has ever been presented regarding phylogenetically close-relatives to this bacterium.

Genes involved in RNA translation were up-regulated (*rpl* and *rpm* family genes among others) in both bacteria which could indicate an important protein synthesis activity and corroborates the fact that up-regulation of genes would lead to a greater protein synthesis. Genes involved in DNA synthesis were equally up- and down-regulated which may indicate a basal DNA synthesis in both bacteria.

3.3.4. Combined stress response

Since no reference is available on gastric-like stress followed by duodenal stress, interpreting the results is somehow challenging. From a pure comparative point of view, combined stress response of *H. alvei* GB001 seems to be an intermediate between gastric and duodenal stress response. The global picture of which functional groups are mainly up- or down-regulated looks like a mix of gastric and duodenal stress patterns (Figure 2 C). Likewise, regarding detailed response already described in the previous sections, genes encoding general stress proteins or response to oxidative stress are a mix between the two separately applied stresses.

In the case of *S. equorum* Mu2, the response to combined stress looked very much alike gastric stress. Indeed, the general pattern represented in Figure 3 C (combined stress) is close to Figure 3A (gastric). Moreover, the loss of viability was very comparable during gastric and combined challenge (around 3 log CFU/mL). Therefore, since duodenal challenge was much better handled by the bacteria (no loss of viability), it appears likely that consequences of gastric stress will predominate in case of gastric stress followed by duodenal stress.

Altogether, our results might indicate that *H. alvei* GB001 is almost equally sensitive to both gastric and duodenal-like stresses although *S. equorum* Mu2 is far more sensitive to gastric-like than duodenal-like stress.

4. Conclusion

To conclude about the transcriptomic response of *S. equorum* Mu2 and *H. alvei* GB001, we can say that (i) from an overall perspective, both species managed to orientate part of their native metabolism to fight the environmental stress, (ii) some specific responses have been identified for each strain. For instance, *S. equorum* Mu2 is more sensitive to gastric-like stress than *H. alvei* GB001. Regulation profiles of translation-related genes corroborate this findings. On a more specific level, *S. equorum* Mu2 clearly activated its reductase and hydrogenases complexes while encountering gastric-like stress. Polyamines biosynthesis seems to be of importance in the acid-stress resistance as well. The response to duodenum like stress involved an important up-regulation of multi drug resistance transporters, thus suggesting an active secretion of bile acid out of the cells. As for *H. alvei* GB001, it is to notice cysteine metabolism appeared to be of importance in the resistance to gastric-like stress, along with the decarboxylation of amino acids and more specifically glutamate. Further research into the Hydrogenase “Hyd” complexes we identified, would be highly relevant to see whether we could identify the role of each complex in response to gastric stress. For some hypotheses, the literature offered a comparison permitting to justify the link we made between the up- or down-regulation of certain genes and the response to digestive stress.

This transcriptome analysis study will be completed by an analysis of the proteome of both strains submitted to the gastric-like challenge. Further work could consist in studying the impact of the preadaptation of these microorganisms in real ripening conditions. Indeed, previous results (Adouard et al. unpublished data, Chap.2) indicated the resistance to digestive stress seemed to be influenced by a growth in actual ripening conditions.

Acknowledgements

The present work was funded by the Centre National Interprofessionnel de *l'Economie Laitière* (as part of the EcoDige project 2012-2015), the INRA's CEPIA department and AgroParisTech.

References

- Anders, S., P. T. Pyl and W. Huber (2014). "HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data." *Bioinformatics*.
- Barrie Johnson, D. and K. B. Hallberg (2008). "Carbon, iron and sulfur metabolism in acidophilic micro-organisms." *Advances in microbial physiology* 54: 201-255.
- Begley, M., C. G. M. Gahan and C. Hill (2005). "The interaction between bacteria and bile." *FEMS Microbiology Reviews* 29(4): 625-651.
- 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. Series B (Methodological)*: 289-300.
- Beresford, T. P., N. A. Fitzsimons, N. L. Brennan and T. M. Cogan (2001). "Recent advances in cheese microbiology." *International Dairy Journal* 11(4): 259-274.
- Bernstein, C., H. Bernstein, C. M. Payne, S. E. Beard and J. Schneider (1999). "Bile salt activation of stress response promoters in *Escherichia coli*." *Curr Microbiol* 39(2): 68-72.
- Bolger, A. M., M. Lohse and B. Usadel (2014). "Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data." *Bioinformatics*: btu170.
- Buffet-Bataillon, S., P. Tattevin, M. Bonnaure-Mallet and A. Jolivet-Gougeon (2012). "Emergence of resistance to antibacterial agents: the role of quaternary ammonium compounds—a critical review." *International Journal of Antimicrobial Agents* 39(5): 381-389.
- Cotter, D. Paul, Hill and Colin (2003). *Surviving the acid test: Responses of gram-positive bacteria to low pH*. Washington, DC, ETATS-UNIS, American Society for Microbiology.
- Cousin, F. J., D. D. G. Mater, B. Foligne and G. Jan (2011). "Dairy propionibacteria as human probiotics: A review of recent evidence." *Dairy Science & Technology* 91(1): 1-26.
- Darwin, A. J. (2005). "The phage-shock-protein response." *Mol Microbiol* 57(3): 621-628.
- Farr, S. B. and T. Kogoma (1991). "Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*." *Microbiological reviews* 55(4): 561-585.
- Gardiner, G., C. Stanton, P. B. Lynch, J. K. Collins, G. Fitzgerald and R. P. Ross (1999). "Evaluation of Cheddar Cheese as a Food Carrier for Delivery of a Probiotic Strain to the Gastrointestinal Tract." *Journal of Dairy Science* 82(7): 1379-1387.
- Gardiner, G. E., R. P. Ross, J. M. Wallace, F. P. Scanlan, P. P. Jagers, G. F. Fitzgerald, J. K. Collins and C. Stanton (1999). "Influence of a probiotic adjunct culture of *Enterococcus faecium* on the quality of cheddar cheese." *J Agric Food Chem* 47(12): 4907-4916.

- Günzel, D., L. M. Kucharski, D. G. Kehres, M. F. Romero and M. E. Maguire (2006). "The MgtC virulence factor of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium activates Na⁺, K⁺-ATPase." *Journal of Bacteriology* 188(15): 5586-5594.
- Hartl, F. U. (1996). "Molecular chaperones in cellular protein folding." *Nature* 381(6583): 571-580.
- Hayes, E. T., J. C. Wilks, P. Sanfilippo, E. Yohannes, D. P. Tate, B. D. Jones, M. D. Radmacher, S. S. BonDurant and J. L. Slonczewski (2006). "Oxygen limitation modulates pH regulation of catabolism and hydrogenases, multidrug transporters, and envelope composition in *Escherichia coli* K-12." *BMC microbiology* 6(1): 89.
- Heuman, D. M., R. S. Bajaj and Q. Lin (1996). "Adsorption of mixtures of bile salt taurine conjugates to lecithin-cholesterol membranes: implications for bile salt toxicity and cytoprotection." *Journal of Lipid Research* 37(3): 562-573.
- Irlinger, F., V. Loux, P. Bento, J. F. Gibrat, C. Straub, P. Bonnarne, S. Landaud and C. Monnet (2012). "Genome Sequence of *Staphylococcus equorum* subsp *equorum* Mu2, Isolated from a French Smear-Ripened Cheese." *Journal of Bacteriology* 194(18): 5141-5142.
- Janda, J. M., S. L. Abbott, S. Khashe and W. Probert (2002). "Phenotypic and genotypic properties of the genus *Hafnia*." *Journal of Medical Microbiology* 51(7): 575-622.
- Kanehisa, M., S. Goto, Y. Sato, M. Furumichi and M. Tanabe (2012). "KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets." *Nucleic Acids Research* 40(D1): D109-D114.
- Krulwich, T. A., M. Ito and A. A. Guffanti (2001). "The Na⁽⁺⁾dependence of alkaliphily in *Bacillus*." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1505(1): 158-168.
- Krulwich, T. A., G. Sachs and E. Padan (2011). "Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis." *Nat Rev Micro* 9(5): 330-343.
- Kumura, H., Y. Tanoue, M. Tsukahara, T. Tanaka and K. Shimazaki (2004). "Screening of Dairy Yeast Strains for Probiotic Applications." *Journal of Dairy Science* 87(12): 4050-4056.
- Langmead, B., C. Trapnell, M. Pop and S. L. Salzberg (2009). "Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome." *Genome Biol* 10(3): R25.
- Lay, C., M. Sutren, P. Lepercq, C. Juste, L. Rigottier-Gois, E. Lhoste, R. Lemee, P. Le Ruyet, J. Dore and C. Andrieux (2004). "Influence of Camembert consumption on the composition and metabolism of intestinal microbiota: a study in human microbiota-associated rats." *Br J Nutr* 92(3): 429-438.
- Love, M. I., W. Huber and S. Anders (2014). "Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-Seq data with DESeq2." *bioRxiv*.
- Merritt, M. E. and J. R. Donaldson (2009). "Effect of bile salts on the DNA and membrane integrity of enteric bacteria." *Journal of Medical Microbiology* 58(12): 1533-1541.

- Møller, J. V., B. Juul and M. le Maire (1996). "Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes* 1286(1): 1-51.
- Mounier, J., C. Monnet, T. Vallaey, R. Arditi, A. S. Sarthou, A. Helias and F. Irlinger (2008). "Microbial interactions within a cheese microbial community." *Appl Environ Microbiol* 74(1): 172-181.
- Noguchi, K., D. P. Riggins, K. C. Eldahan, R. D. Kitko and J. L. Slonczewski (2010). "Hydrogenase-3 Contributes to Anaerobic Acid Resistance of *Escherichia coli*." *PLoS ONE* 5(4): e10132.
- Pao, S. S., I. T. Paulsen and M. H. Saier (1998). "Major Facilitator Superfamily." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62(1): 1-34.
- Pegg, A. E. and R. A. Casero (2009). "Current Status of the Polyamine Research Field." *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 720: 3-35.
- Psomas, E., C. Andrighetto, E. Litopoulou-Tzanetaki, A. Lombardi and N. Tzanetakis (2001). "Some probiotic properties of yeast isolates from infant faeces and Feta cheese." *International Journal of Food Microbiology* 69(1&2): 125-133.
- Ruiz, L., A. Margolles and B. Sanchez (2013). "Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*." *Frontiers in Microbiology* 4.
- Saarela, M., G. Mogensen, R. Fond  n, J. M  tt   and T. Mattila-Sandholm (2000). "Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties." *Journal of Biotechnology* 84(3): 197-215.
- Salque, M., P. I. Bogucki, J. Pyzel, I. Sobkowiak-Tabaka, R. Grygiel, M. Szmyt and R. P. Evershed (2012). "Earliest evidence for cheese making in the sixth millennium bc in northern Europe." *Nature advance online publication*.
- Saxelin, M., A. Lassig, H. Karjalainen, S. Tynkkynen, A. Surakka, H. Vapaatalo, S. J   rvenp     , R. Korpela, M. Mutanen and K. Hatakka (2010). "Persistence of probiotic strains in the gastrointestinal tract when administered as capsules, yoghurt, or cheese." *International Journal of Food Microbiology* 144(2): 293-300.
- Sumeri, I., S. Adamberg, R. Uusna, I. Sarand and T. Paalme (2012). "Survival of cheese bacteria in a gastrointestinal tract simulator." *International Dairy Journal*(0).
- Tajiri, M., S. Yoshida and Y. Wada (2005). "Differential analysis of site-specific glycans on plasma and cellular fibronectins: application of a hydrophilic affinity method for glycopeptide enrichment." *Glycobiology* 15(12): 1332-1340.
- Thomas, J. G. and F. o. Baneyx (1998). "Roles of the *Escherichia coli* Small Heat Shock Proteins IbpA and IbpB in Thermal Stress Management: Comparison with ClpA, ClpB, and HtpG In Vivo." *Journal of Bacteriology* 180(19): 5165-5172.

3. Résultats marquants et traitement en cours

H.alvei faisant partie des entérobactéries et étant assez proche de l'espèce *Escherichia coli*, la comparaison avec les données bibliographiques a été plus concluante que les comparaisons concernant *S.equorum* avec d'autres bactéries à Gram-positif aux caractéristiques parfois très éloignées.

D'une manière générale, l'exposition aux stress digestifs batch, dans les conditions choisies, a conduit à une expression différentielle importante du génome (d'environ 35 à plus de 60 %) des deux bactéries, en comparaison avec les mêmes bactéries non stressées. Ceci indique que pour que ces micro-organismes survivent, leurs métabolismes doivent s'adapter de manière drastique aux conditions extérieures contraignantes. Différents gènes impliqués dans la réponse générale au stress ont été sur-exprimés dans toutes les conditions de stress, de même que la réponse au stress oxydatif et la réparation des dommages causés à l'ADN. Le métabolisme basal de chaque bactérie a été sous-régulé, de manière à permettre de concentrer ses ressources sur sa réponse au stress. *Hafnia alvei*, identifiée comme la bactérie la plus résistante à l'ensemble des stress dans les chapitres précédents (Chapitre 1 & 2), a montré une activité de traduction de protéines en accord avec ces observations. *Staphylococcus equorum*, plus sensible, a vu sa traduction protéique fortement réprimée lors du stress le plus contraignant (i.e gastrique). Certaines réponses spécifiques ont été identifiées pour chacune des bactéries.

Les résultats préliminaires exposés dans ce dernier chapitre nous ont permis d'avoir une première idée des principales stratégies que deux micro-organismes d'origine alimentaire peuvent mettre en place pour contrer les stress digestifs et ainsi survivre au processus de digestion. Les transcriptomes obtenus pourront faire l'objet d'analyses ciblées différentes, notamment concernant le lien entre l'expression de motifs bactériens de surface et leur reconnaissance par le système immunitaire. Ce point sera discuté plus en détail dans la section listant les perspectives de cette thèse.

Cet article et ce chapitre en général est encore inabouti et nécessitera un travail plus approfondi avant publication. Trois points à approfondir sont notamment listés ci-après.

Exploitation des données transcriptomiques :

- ré-annotation fonctionnelle des micro-organismes (réduire le nombre de « putatives » ou « uncharacterised » proteins)
- Recherche de références bibliographiques décrivant des mécanismes de réponses correspondant aux voies identifiées
- Utilisation d'outils de visualisation pour faire la part de ce qui peut être induit par l'application de chacun des stress (i.e. gastrique et duodénal) lors du stress combiné

Traitement des données protéomiques

Validation de certaines hypothèses établies (mise en évidence de métabolismes particuliers)

- Mesure du CO₂ produit en condition de stress acide et combiné notamment afin de mettre en évidence l'activité des décarboxylases.

Conclusion

- & -

Perspectives

CONCLUSION

Lorsque le projet ECODIGE a débuté en octobre 2011, les objectifs étaient de savoir si une sélection de micro-organismes fromagers pouvait survivre au phénomène de digestion et induire une réponse immunomodulatrice. En effet, exception faite des pathogènes et des probiotiques d'origine laitière, aucune étude ne s'était intéressée aux micro-organismes « technologiques » s'implantant lors de l'affinage et, donc, présents en quantité importante lors de la consommation du fromage. L'expertise du GMPA concernant ces flores et le développement d'un outil de digestion dynamique, a permis de construire ce projet de thèse. L'Institut Pasteur de Lille, avec son expertise concernant l'immunomodulation et les modèles permettant son étude, a complété les compétences nécessaires à la construction de la démarche.

Ce travail de thèse a utilisé une approche à l'interface de l'*in vitro* et de l'*in vivo* dont les résultats peuvent être résumés de la manière suivante :

Certaines levures et bactéries d'origine fromagère peuvent résister au stress digestif et la croissance en écosystème peut avoir une influence sur la future capacité à résister au stress digestif de ces micro-organismes.

Méthodes utilisées :

- Screening statique /dynamique
- Impact de la croissance en écosystème et « validation » *in vivo*
- Réponse transcriptomique d'une bactérie à Gram positif et d'une bactérie à Gram-négatif

Les résultats du stress digestif *in vitro* batch ont permis de mettre en évidence une très bonne résistance des levures et des bactéries à Gram-négatif, et ce, aussi bien pour une exposition à l'un des deux stress qu'à la combinaison des deux. Les bactéries à Gram-positif ont donné des résultats plus contrastés. Elles ont été plus sensibles que les bactéries à Gram-négatif et la majeure partie n'a pas résisté à l'exposition à un stress estomac puis un stress duodénum. Si l'on rentre dans le détail du stress le plus délétère, les conditions de l'estomac sont celles qui sont responsables de la perte de viabilité la plus importante.

L'utilisation d'un digesteur dynamique a permis d'obtenir une image légèrement différente des expérimentations réalisées en batch. En effet, les stress étant appliqués de manière progressive - contrairement aux stress chocs du modèle batch - les micro-organismes n'ayant pas survécu aux stress batch se sont avérés capable de supporter le passage dans l'intégralité du DIDGI.

Ces observations ont été confirmées lors des expérimentations en modèles murins impliquant des microbiotes fromagers cultivés en condition d'affinage réel. Par ailleurs, concernant la croissance en écosystème fromager, certaines souches bactériennes et levuriennes ont montré une résistance au stress digestif diminuée par rapport à une culture en milieu synthétique (comparaison disponible uniquement pour les expérimentations en DIDGI). Nous pouvons donc dire que la croissance en environnement fromager n'est pas sans effet sur la capacité des micro-organismes à survivre aux stress digestifs et que le simple effet protecteur de la présence d'une matrice n'est pas le seul à devoir être pris en considération lorsque l'on considère le fromage comme « vecteur ».

La caractérisation plus fine de la réponse au (i) stress gastrique, (ii) au stress duodéal et (iii) à la combinaison des deux stress d'une bactérie à Gram-négatif et d'une bactérie à Gram-positif, a permis de mettre en évidence des réponses communes aux deux micro-organismes, comme la surexpression de gènes codants pour des protéines de réponse générale au stress ou encore une sous-expression de certains gènes du métabolisme basal ; mais aussi des réponses spécifiques à chaque micro-organisme. En effet, la bactérie à Gram-négatif a, entre-autre, surexprimé des gènes codant pour des enzymes du métabolisme de la cystéine ou encore impliqués dans la décarboxylation du glutamate. Toujours en cas de stress gastrique, la bactérie à Gram-positif a, quant à elle, s'est traduit par la surexpression des gènes codant pour la biosynthèse des polyamines. La réponse au stress duodéal a montré la surexpression de gènes codants pour la famille des transporteurs « multi drug resistance », semblant indiquer une excrétion des sels biliaires par les cellules. Le stress combiné a donné un profil d'expression plutôt semblable à celui du stress gastrique dans le cas de la bactérie à Gram-positif, et un profil intermédiaire entre le stress gastrique et le stress duodéal pour la bactérie à Gram-négatif.

Certains micro-organismes d'origine fromagère peuvent induire une réponse immunomodulatrice.

Méthodes utilisées :

- Typage PBMCs micro-organismes isolés et en combinaison
- Modèle de colite

Les PBMCs nous ont permis de mettre en évidence une diversité de réponse importante aussi bien intra- qu'inter-souches. En effet, certaines bactéries à Gram-positif et deux genres de levures ont montré un profil plutôt anti-inflammatoire quelque soit la souche testée. *A contrario*, un genre eucaryote ainsi que l'espèce représentant les bactéries à Gram-négatif et deux autres genres de

bactéries à Gram-positif, ont montré des profils différents parmi les 3 souches testées au sein de chacune de ces espèces. Le mélange de souches à caractère majoritairement pro-inflammatoire ou majoritairement anti-inflammatoire, lorsqu'elles sont testées en culture pure, a induit une réponse des mélanges identiques (*i.e.* induction de cytokines pro-inflammatoires pour le mélange de souches aux profils pro-inflammatoires et inversement dans le cas du mélange de souches anti-inflammatoires).

Concernant les fromages conçus avec des microbiotes aux profils immunomodulateurs opposés, leur consommation ne perturbe pas l'homéostasie intestinale d'un individu sain. En revanche, en cas de maladie inflammatoire de l'intestin, les modèles précliniques utilisés indiquent que (i) la translocation des micro-organismes au sein d'une muqueuse inflammée n'est pas anodine, (ii) la consommation d'un fromage plutôt pro-inflammatoire peut aggraver les symptômes. La consommation d'un fromage au microbiote plutôt anti-inflammatoire ne semble pas montrer de protection dans les modèles étudiés. Ainsi, la flore d'affinage des fromages à pâte molle ne serait pas neutre d'un point de vue immunomodulateur concernant une inflammation de type IBD en modèle murin.

PERSPECTIVES DE RECHERCHE

1. Perfectionnement et utilisations futures du digesteur dynamique « DIDGI »

Lors des expérimentations réalisées avec le DIDGI, nous avons conservé les mêmes paramètres, quelle que soit la matrice utilisée. Ce choix a été nécessaire afin de rendre comparable les résultats obtenus lors de la digestion de micro-organismes (i) cultivés séparément en milieu synthétique, (ii) cultivés en milieu synthétique puis mélangés, (iii) cultivés séparément en milieu synthétique puis mélangés et inclus dans un gel présure, (iv) cultivés en conditions réelles d'affinage.

Or, il a été montré que la nature du bol alimentaire influençait la vidange et l'acidification de l'estomac (voir section 1.1.2.3 concernant la vidange gastrique). Afin de se rapprocher un peu plus des conditions réelles de digestion, il serait intéressant de mettre en place un plan d'expérience faisant varier dans le même temps cinétique d'acidification et cinétique de transfert (estomac et duodénum). L'utilisation de l'outil mathématique « plan d'expérience » permettrait, en limitant le nombre d'expérimentations, d'obtenir une image plus précise de l'incidence de la modification des deux paramètres précédemment cités sur la survie des micro-organismes.

2. Caractérisation plus fine de la réponse au stress digestif des micro-organismes

L'analyse du transcriptome (en lien avec celle prochainement disponible du protéome) des deux bactéries en condition de stress digestif, nous a permis d'obtenir des informations sur les stratégies adaptatives mises en place par la cellule afin de survivre au stress digestif. Les résultats intéressants obtenus pour les bactéries nous encourageraient à appliquer la même démarche sur des eucaryotes. Il pourrait aussi être intéressant de suivre l'évolution de la réponse des micro-organismes de manière cinétique et pas seulement en point final comme cela a été le cas lors des travaux évoqués dans le Chapitre 4. Un certain nombre de gènes d'intérêt identifiés pourraient alors être suivis en qPCR.

Cette analyse à l'échelle moléculaire profiterait à être complétée par une analyse de la réponse métabolique à l'échelle cellulaire. Durant ces travaux de thèse, la cytométrie en flux a été investiguée. Nous avons tenté le marquage de certaines espèces afin de séparer les populations viables, mortes ou altérées avec des marqueurs fluorescents (Rault et al., 2005). Ces mises au point se sont avérées concluantes pour les levures ainsi que pour certaines espèces de bactéries en culture pure. Cependant, l'ajout des constituants des jus digestifs a rendu la lecture des résultats impossible et l'ajout d'une matrice fromagère interférait avec le marquage des cellules.

Ces travaux ont représenté plusieurs mois de travail et ont permis de mettre en évidence le potentiel de la cytométrie en flux concernant des micro-organismes qui n'avaient encore jamais fait l'objet de mise au point avec cette technique. Cependant, la nécessité de pousser encore plus avant cette mise au point afin de pouvoir utiliser la cytométrie en flux pour caractériser la réponse physiologique de la cellule en condition de stress, nous a conduit à laisser de côté cette technique dans le temps imparti pour ces travaux. Pour conclure sur l'intérêt de la cytométrie en flux dans la caractérisation cellulaire de la réponse au stress digestif de micro-organismes, des paramètres tels que la dépolarisation membranaire, le pH intracellulaire ou encore la réponse au stress oxydant, peuvent être suivis par des marquages spécifiques. Les travaux de thèse d'H.Velly (2014) concernant la réponse au stress subi par *Lactococcus lactis* lors de la lyophilisation ont permis de mettre en évidence que l'utilisation de ces différents marqueurs de l'activité de la cellule pouvait permettre d'obtenir une image assez complète des activités métaboliques que les cellules peuvent mettre en place pour lutter contre les stress environnementaux.

3. Analyse *in silico* des génomes disponibles et utilisation des données transcriptomiques obtenues lors des expérimentations de stress digestif *in vitro*

Nous avons à notre disposition un certain nombre de génomes parmi les micro-organismes inclus retenus pour ces travaux de thèse. Une analyse *in silico* pourrait permettre d'émettre un certain nombre d'hypothèses concernant :

- La recherche, dans les génomes d'espèces résistantes ou non au stress digestif (*i.e.* ayant perdu la capacité à se développer sur boîte de Petri après avoir subi un ou plusieurs stress digestifs), de fonctions identifiées comme importantes dans cette résistance au stress chez les deux bactéries dont nous avons analysé le transcriptome.
- L'identification d'éléments exprimés en surface de cellules ou d'éléments excrétés par des souches de la même espèce aux profils immunomodulateurs différents. Ceci en comparaison de motifs de surface ou de molécules sécrétées déjà identifiées comme impliquées dans l'une ou l'autre des réponses immunomodulatrices.
- La recherche de différences entre les éléments exprimés en surface et/ou sécrétés chez une bactérie en condition basale et en condition de stress afin d'obtenir des éléments sur le lien entre la réponse au stress du micro-organisme et son éventuelle capacité à induire une réponse immunomodulatrice lorsqu'il entre en contact avec le système immunitaire de l'hôte.

4. Dialogues entre microbiote fromager et microbiote intestinal : une langue commune ?

L'incidence de la consommation de nos fromages « pro- » et « anti- » inflammatoires sur le microbiote intestinal n'a pas été étudiée dans ces travaux de thèse. L'utilisation d'outils *in vitro* comme des réacteursensemencés avec une flore colique modèle (Payne et al., 2012), ou encore l'analyse des équilibres de la flore colique de souris modèles après consommation de nos fromages, pourraient permettre d'obtenir des éléments sur la modification potentiel du microbiote de l'hôte. Ce champs d'investigation, déjà fortement étudié concernant les micro-organismes dits « probiotiques » semble prometteur, comme le montre des résultats récents concernant le fromage (David et al. 2014) et du lait fermenté (Veiga et al. 2014).

5. Lien entre matrice, résistance au stress digestif et potentiel immunomodulateur

Lors de ces travaux, nous avons brièvement abordé l'incidence de la présence d'une matrice et de son effet protecteur quant aux stress digestifs *in vitro* (Chapitre 1 et Chapitre 2). Nous avons également vu que la préadaptation des micro-organismes à une matrice – *i.e.* le développement d'un microbiote en conditions d'affinage réelles – a modifié le profil de survie aux stress digestifs dynamiques *in vitro* (Chapitre 2). Ainsi la présence et le développement au sein de cette matrice mériteraient d'être investigués plus en détail et, ce, pour plusieurs raisons :

- Les caractéristiques physico-chimiques de la matrice fromagère comme sa composition biochimique ou la structure, peuvent à la fois avoir un effet tampon mais aussi limiter physiquement la diffusion de molécules telles que les sels biliaires ou encore retarder la diffusion des protons dans certaines zones dans lesquelles les micro-organismes seraient donc protégés. Des outils de microscopie ont d'ailleurs été utilisés dans le cadre d'un projet parallèle (Ecobiote, financement INRA, 2012-2014, coordination Daniel Picque) afin de mieux comprendre comment s'organisent les micro-organismes lors de l'inclusion dans un gel laitier, ainsi que la position des lipides et des protéines dans leur voisinage direct.

- La préadaptation à la matrice fromagère ne s'est pas forcément avérée améliorer la résistance aux stress digestifs de certaines espèces. Comme nous l'avons vu dans la section consacrée à la réponse au stress digestif de la synthèse bibliographique, la pré-exposition à certains stress sub-létaux peuvent aussi bien protéger que sensibiliser à un stress ultérieur. Ainsi, un certain nombre de gène d'intérêts identifiés comme importants dans la réponse au stress digestif, pourraient alors être suivis en qPCR, lors de l'application de stress digestifs *in vitro* à des micro-organismes prélevés à différents temps d'affinage. De plus, cette transformation de la matrice par le microbiote (protéolyse, lipolyse) conduit à la formation de métabolites dont le potentiel immunomodulateur pourrait, en lui-même, être investigué. En effet, les travaux présentés dans le Chapitre 3 concernant les modèles murins de colites et leur réponse aux fromages « pro-« et « anti-inflammatoire » fait état d'une réponse globale au fromage, qui semble liée au profil du microbiote choisi avant son développement au sein du fromage. Cependant, nous n'avons pas isolé les micro-organismes de leur matrice et il est probable que leur capacité à exprimer certains motifs en surface et/ou à produire certains métabolites issus de la dégradation de la matrice, soit liée aux macro et micronutriments disponibles dans le caillé fromager.

- Bibliographie -

Bibliographie

- Akbar, S., T. A. Gaidenko, C. M. Kang, M. O'Reilly, K. M. Devine and C. W. Price (2001). "New Family of Regulators in the Environmental Signaling Pathway Which Activates the General Stress Transcription Factor σ^B of *Bacillus subtilis*." *Journal of bacteriology* 183(4): 1329-1338.
- Alais, C. (1975). *Science du lait: principes des techniques laitières*, Société d'édition et de publicité agricoles industrielles et commerciales.
- Anson, N. M., E. Selinheimo, R. Havenaar, A.-M. Aura, I. Mattila, P. Lehtinen, A. Bast, K. Poutanen and G. R. Haenen (2009). "Bioprocessing of wheat bran improves in vitro bioaccessibility and colonic metabolism of phenolic compounds." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(14): 6148-6155.
- Bäckhed, F., R. E. Ley, J. L. Sonnenburg, D. A. Peterson and J. I. Gordon (2005). "Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine." *Science* 307(5717): 1915-1920.
- Barbosa, J., S. Borges, R. Magalhaes, V. Ferreira, I. Santos, J. Silva, G. Almeida, P. Gibbs and P. Teixeira (2012). "Behaviour of *Listeria monocytogenes* isolates through gastro-intestinal tract passage simulation, before and after two sub-lethal stresses." *Food Microbiology* 30(1): 24-28.
- Bauerfeind, P., R. Garner, B. Dunn and H. Mobley (1997). "Synthesis and activity of *Helicobacter pylori* urease and catalase at low pH." *Gut* 40(1): 25-30.
- Begley, M., C. G. Gahan and C. Hill (2002). "Bile stress response in *Listeria monocytogenes* LO28: adaptation, cross-protection, and identification of genetic loci involved in bile resistance." *Applied and Environmental Microbiology* 68(12): 6005-6012.
- Begley, M., C. G. M. Gahan and C. Hill (2005). "The interaction between bacteria and bile." *FEMS Microbiology Reviews* 29(4): 625-651.
- Begley, M., C. G. M. Gahan and C. Hill (2005). "The interaction between bacteria and bile." *FEMS Microbiology Reviews* 29(4): 625-651.
- Begley, M., C. Hill and C. G. Gahan (2003). "Identification and disruption of *btIA*, a locus involved in bile tolerance and general stress resistance in *Listeria monocytogenes*." *FEMS microbiology letters* 218(1): 31-38.
- Beresford, T., A. Williams and P. L. H. M. T. M. C. a. T. P. G. Patrick F. Fox (2004). *The Microbiology of Cheese Ripening. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Academic Press. Volume 1: 287-317.
- Bernstein, C., H. Bernstein, C. M. Payne, S. E. Beard and J. Schneider (1999). "Bile salt activation of stress response promoters in *Escherichia coli*." *Curr Microbiol* 39(2): 68-72.
- Blanquet, S. p., E. Zeijdner, E. Beyssac, J.-P. Meunier, S. Denis, R. Havenaar and M. Alric (2004). "A Dynamic Artificial Gastrointestinal System for Studying the Behavior of Orally Administered Drug Dosage Forms Under Various Physiological Conditions." *Pharmaceutical Research* 21(4): 585-591.

- Bockelmann, W. (2002). "Development of defined surface starter cultures for the ripening of smear cheeses." *International Dairy Journal* 12(2): 123-131.
- Bockelmann, W. (2002). "Development of defined surface starter cultures for the ripening of smear cheeses." *International Dairy Journal* 12(2): 123-131.
- Bonaiti, C., F. Irlinger, H. E. Spinnler and E. Engel (2005). "An iterative sensory procedure to select odor-active associations in complex consortia of microorganisms: application to the construction of a cheese model." *Journal of dairy science* 88(5): 1671-1684.
- Booijink, C. C. G. M., S. El-Aidy, M. Rajilić-Stojanović, H. G. H. J. Heilig, F. J. Troost, H. Smidt, M. Kleerebezem, W. M. De Vos and E. G. Zoetendal (2010). "High temporal and inter-individual variation detected in the human ileal microbiota." *Environmental Microbiology* 12(12): 3213-3227.
- Borgström, B. and C. Erlanson (1973). "Pancreatic Lipase and Co-Lipase." *European Journal of Biochemistry* 37(1): 60-68.
- Boylston, T. D., C. G. Vinderola, H. B. Ghoddusi and J. A. Reinheimer (2004). "Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards." *International Dairy Journal* 14(5): 375-387.
- Bravo, L., P. Siddhuraju and F. Saura-Calixto (1998). "Effect of Various Processing Methods on the in Vitro Starch Digestibility and Resistant Starch Content of Indian Pulses." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(11): 4667-4674.
- Brennan, N. M., T. M. Cogan, M. Loessner, S. Scherer and P. L. H. M. T. M. C. a. T. P. G. Patrick F. Fox (2004). Bacterial surface-ripened cheeses. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Academic Press. Volume 2: 199-225.
- Calbet, J. A. and D. A. MacLean (1997). "Role of caloric content on gastric emptying in humans." *The Journal of Physiology* 498(Pt 2): 553-559.
- Caparello, C., I. Bravi, P. Cantu, A. Grigolon, A. Tenca, A. Mauro and R. Penagini (2012). "Traditional vs wireless intragastric pH monitoring: are the two techniques comparable?" *Neurogastroenterology and Motility* 24(10).
- Carriere, F., J. A. Barrowman, R. Verger and R. Laugier (1993). "Secretion and contribution to lipolysis of gastric and pancreatic lipases during a test meal in humans." *Gastroenterology* 105(3): 876-888.
- Chamba, J. and F. Irlinger (2004). "Secondary and adjunct cultures." *Cheese: chemistry, physics and microbiology* 1: 191-206.
- Chapman, C. M. C., G. R. Gibson and I. Rowland (2011). "Health benefits of probiotics: are mixtures more effective than single strains?" *European Journal of Nutrition* 50(1): 1-17.
- Charteris, W. P., P. M. Kelly, L. Morelli and J. K. Collins (1998). "Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract." *J Appl Microbiol* 84(5): 759-768.

- Charteris, W.P. and Kelly, P.M. (1992) Phenotypic properties of potentially probiotic lactobacilli for humans. In First Annual Report, EU FLAIR Project No. AGRF-CT91-0053 ed. Morelli, L. September 1992. Brussels: Commission of the European Communities
- Choisy, C., Desmazeaud, M., Gripon, J. C., Lamberet, G. & Lenoir, J. (1997a). La biochimie de l'affinage. In Le fromage, Edited by Eck, A. & Gillis J. C. Paris: Technique Documentation, Lavoisier. 86-153.
- Cholet, O., A. Hénaut, S. Casaregola and P. Bonnarne (2007). "Gene Expression and Biochemical Analysis of Cheese-Ripening Yeasts: Focus on Catabolism of L-Methionine, Lactate, and Lactose " *Appl Environ Microbiol* 73(8): 2561-2570.
- Cogan, T.M, Georges, S., Gelsomino, R., Larpin, S., Hohenegger, M., Bora, N., Jamet, E., Rea, M.C., Mounier, J., Vancanneyt, M., Guéguen, M., Démasures, N., Swings, J., Goodfellow, M., Ward, A.C., Sebastiani, H., Irlinger, F., Chamba, J-F., Beduhn, R., Scherer, S. (2014) Biodiversity of the surface microbial consortia from Limburger, Reblochon, Livarot, Tilsit, Reblochon, Livarot, Tilsit, and Gubeen cheeses. In *Cheese and Microbes* edited by Donnelly, C., American Society for Microbiology, 219-250.
- Collins, J., G. Thornton and G. Sullivan (1998). "Selection of probiotic strains for human applications." *International Dairy Journal* 8(5): 487-490.
- Collins, J.K. and Thornton, G.M. (1994) Survival of core strains of lactobacilli and bifidobacteria in human gastric juice and gall bladder bile. In Report of the Third Annual Meeting of Contractants. EU FLAIR Project No. AGRF-CT91-0053. Athens, Greece.
- Cotter, P. D., N. Emerson, C. G. Gahan and C. Hill (1999). "Identification and disruption of *lisRK*, a genetic locus encoding a two-component signal transduction system involved in stress tolerance and virulence in *Listeria monocytogenes*." *Journal of bacteriology* 181(21): 6840-6843.
- Cotter, D. Paul, Hill and Colin (2003). *Surviving the acid test: Responses of gram-positive bacteria to low pH*. Washington, DC, ETATS-UNIS, American Society for Microbiology.
- Cousin, F. J., D. D. G. Mater, B. Foligne and G. Jan (2011). "Dairy propionibacteria as human probiotics: A review of recent evidence." *Dairy Science & Technology* 91(1): 1-26.
- David, L. A., C. F. Maurice, R. N. Carmody, D. B. Gootenberg, J. E. Button, B. E. Wolfe, A. V. Ling, A. S. Devlin, Y. Varma, M. A. Fischbach, S. B. Biddinger, R. J. Dutton and P. J. Turnbaugh (2014). "Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome." *Nature* 505(7484): 559-+.
- Deat, E., S. Blanquet-Diot, J. F. Jarrige, S. Denis, E. Beyssac and M. Alric (2009). "Combining the dynamic TNO-gastrointestinal tract system with a Caco-2 cell culture model: application to the assessment of lycopene and alpha-tocopherol bioavailability from a whole food." *J Agric Food Chem* 57(23): 11314-11320.
- Dupont, D., G. Mandalari, D. Molle, J. Jardin, J. Léonil, R. M. Faulks, M. S. J. Wickham, E. N. Clare Mills and A. R. Mackie (2009). "Comparative resistance of food proteins to adult and infant in vitro digestion models." *Molecular Nutrition & Food Research* 54(6): 767-780.

- Egert, M., A. A. De Graaf, A. Maathuis, P. De Waard, C. M. Plugge, H. Smidt, N. E. P. Deutz, C. Dijkema, W. M. De Vos and K. Venema (2007). "Identification of glucose-fermenting bacteria present in an in vitro model of the human intestine by RNA-stable isotope probing." *FEMS Microbiology Ecology* 60(1): 126-135.
- Elashoff, J. D., T. J. Reedy and J. H. Meyer (1982). "Analysis of gastric emptying data." *Gastroenterology* 83(6): 1306-1312.
- Farr, S. B. and T. Kogoma (1991). "Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*." *Microbiological reviews* 55(4): 561-585.
- Fioramonti, J., V. Theodorou and L. Bueno (2003). "Probiotics: what are they? What are their effects on gut physiology?" *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 17(5): 711-724.
- Firmesse, O., E. Alvaro, A. s. Mogenet, J.-L. Bresson, R. LemÃ©, P. Le Ruyet, C. c. Bonhomme, D. Lambert, C. Andrieux, J. I. Doré G. r. Corthier, J.-P. Furet and L. Rigottier-Gois (2008). "Fate and effects of Camembert cheese micro-organisms in the human colonic microbiota of healthy volunteers after regular Camembert consumption." *International Journal of Food Microbiology* 125(2): 176-181.
- Flahaut, S., J. Frere, P. Boutibonnes and Y. Auffray (1996). "Comparison of the bile salts and sodium dodecyl sulfate stress responses in *Enterococcus faecalis*." *Applied and Environmental Microbiology* 62(7): 2416-2420.
- Foligne, B., G. Zoumpopoulou, J. Dewulf, A. Ben Younes, F. Chareyre, J.-C. Sirard, B. Pot and C. Grangette (2007). "A Key Role of Dendritic Cells in Probiotic Functionality." *PLoS ONE* 2(3): e313.
- Foligne, B., S. Nutton, C. Grangette, V. Dennin, D. Goudercourt, S. Poirer, J. Dewulf, D. Brassart, A. Mercenier and B. Pot (2007). "Correlation between in vitro and in vivo immunomodulatory properties of lactic acid bacteria." *World J Gastroenterol* 13(2): 236-243.
- Forquin, M. P., A. Hebert, A. Roux, J. Aubert, C. Proux, J. F. Heilier, S. Landaud, C. Junot, P. Bonnarme and I. Martin-Verstraete (2010). "Global regulation of the response to sulfur availability in the cheese-related bacterium *Brevibacterium aurantiacum*." *Appl Environ Microbiol* 77(4): 1449-1459.
- Gardiner, G. E., R. P. Ross, J. M. Wallace, F. P. Scanlan, P. P. Jagers, G. F. Fitzgerald, J. K. Collins and C. Stanton (1999). "Influence of a probiotic adjunct culture of *Enterococcus faecium* on the quality of cheddar cheese." *J Agric Food Chem* 47(12): 4907-4916.
- Gardiner, G., C. Stanton, P. B. Lynch, J. K. Collins, G. Fitzgerald and R. P. Ross (1999). "Evaluation of Cheddar Cheese as a Food Carrier for Delivery of a Probiotic Strain to the Gastrointestinal Tract." *Journal of Dairy Science* 82(7): 1379-1387.
- Gori, K., M. Ryssel, N. Arneborg and L. Jespersen (2013). "Isolation and Identification of the Microbiota of Danish Farmhouse and Industrially Produced Surface-Ripened Cheeses." *Microbial Ecology* 65(3): 602-615.
- Guerra, A. I., L. Etienne-Mesmin, V. r. Livrelli, S. Denis, S. p. Blanquet-Diot and M. Alric (2012). "Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion." *Trends in Biotechnology* 30(11): 591-600.

- Guillemin, H., B. Perret, D. Picque, O. Menard, and T. Cattenoz (2010) Logiciel StoRM - Stomach and duodenum Regulation and Monitoring, IDDN.FR.00 1.230009.000.R.P.2010.000. 31235. 2010. p. 290 428 lignes
- Hasler, W. L. (2014). "The use of SmartPill for gastric monitoring." *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology* 8(6): 587-600.
- Hawcutt, D. B. and R. L. Smyth (2008). "Drug development for children: how is pharma tackling an unmet need?" *IDrugs* 11(7): 502-507.
- Hellström, P. M., P. Grybäck and H. Jacobsson (2006). "The physiology of gastric emptying." *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology* 20(3): 397-407.
- Hosoya, T., A. Ogawa, F. Sakai and Y. Kadooka (2012). "A cheese-containing diet modulates immune responses and alleviates dextran sodium sulfate-induced colitis in mice." *Journal of dairy science* 95(6): 2810-2818.
- Hunte, C., E. Screpanti, M. Venturi, A. Rimon, E. Padan and H. Michel (2005). "Structure of a Na⁺/H⁺ antiporter and insights into mechanism of action and regulation by pH." *Nature* 435(7046): 1197-1202.
- Hur, S. J., B. O. Lim, E. A. Decker and D. J. McClements (2010). "In vitro human digestion models for food applications." *Food Chemistry* 125(1): 1-12.
- Irlinger, F., S. Layec, H. S. and E. Dugat-Bony (2014). "Cheese rind microbial communities: diversity, composition and origin." *FEMS Microbiology Letters*
- Isolauri, E., H. Majamaa, T. Arvola, I. Rantala, E. Virtanen and H. Arvilommi (1993). "Lactobacillus casei strain GG reverses increased intestinal permeability induced by cow milk in suckling rats." *Gastroenterology* 105(6): 1643-50.
- Kalantzi, L., K. Goumas, V. Kalioras, B. Abrahamsson, J. B. Dressman and C. Reppas (2006). "Characterization of the human upper gastrointestinal contents under conditions simulating bioavailability/bioequivalence studies." *Pharmaceutical Research* 23(1): 165-176.
- Kannan, G., J. Wilks, D. Fitzgerald, B. Jones, S. BonDurant and J. Slonczewski (2008). "Rapid acid treatment of Escherichia coli: transcriptomic response and recovery." *BMC Microbiology* 8(1): 37.
- Kong, F. and R. P. Singh (2008). "Disintegration of solid foods in human stomach." *Journal of Food Science* 73(5): R67-R80.
- Kong, F. and R. P. Singh (2010). "A human gastric simulator (HGS) to study food digestion in human stomach." *Journal of food science* 75(9): E627-E635.
- Krulwich, T. A., G. Sachs and E. Padan (2011). "Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis." *Nat Rev Micro* 9(5): 330-343.
- Kwiatek, M. A., D. Menne, A. Steingoetter, O. Goetze, Z. Forras-Kaufman, E. Kaufman, H. Fruehauf, P. Boesiger, M. Fried, W. Schwizer and M. R. Fox (2009). "Effect of meal volume and calorie load on postprandial gastric function and emptying: studies under physiological conditions by combined

fiber-optic pressure measurement and MRI." *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 297(5): G894-G901.

Labonte, M. E., P. Couture, C. Richard, S. Desroches and B. Lamarche (2013). "Impact of dairy products on biomarkers of inflammation: a systematic review of randomized controlled nutritional intervention studies in overweight and obese adults." *Am J Clin Nutr* 97(4): 706-717.

Lacroix, F. J., A. Cloeckaert, O. Grépinet, C. Pinault, M. Y. Popoff, H. Waxin and P. Pardon (1996). "Salmonella typhimurium *acrB*-like gene: identification and role in resistance to biliary salts and detergents and in murine infection." *FEMS microbiology letters* 135(2-3): 161-167.

Lay, C., M. Sutren, P. Lepercq, C. Juste, L. Rigottier-Gois, E. Lhoste, R. Lemee, P. Le Ruyet, J. Dore and C. Andrieux (2004). "Influence of Camembert consumption on the composition and metabolism of intestinal microbiota: a study in human microbiota-associated rats." *Br J Nutr* 92(3): 429-438.

Lebeer, S., J. Vanderleyden and S. C. J. De Keersmaecker (2010). "Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens." *Nat Rev Micro* 8(3): 171-184.

Lenoir, D. and P. Honegger (1983). "Insulin-like growth factor I (IGF I) stimulates DNA synthesis in fetal rat brain cell cultures." *Developmental Brain Research* 7(2): 205-213.

Leverrier, P., D. Dimova, V. Pichereau, Y. Auffray, P. Boyaval and G. n. I. Jan (2003). "Susceptibility and Adaptive Response to Bile Salts in *Propionibacterium freudenreichii*: Physiological and Proteomic Analysis." *Applied and Environmental Microbiology* 69(7): 3809-3818.

Lollo, P., A. Cruz, P. Morato, C. Moura, L. Carvalho-Silva, C. Oliveira, J. Faria and J. Amaya-Farfan (2012). "Probiotic cheese attenuates exercise-induced immune suppression in Wistar rats." *Journal of dairy science* 95(7): 3549-3558.

Macierzanka, A., A. R. Mackie, B. H. Bajka, N. M. Rigby, F. Nau and D. Dupont (2014). "Transport of Particles in Intestinal Mucus under Simulated Infant and Adult Physiological Conditions: Impact of Mucus Structure and Extracellular DNA." *Plos One* 9(4).

Madsen, K., A. Cornish, P. Soper, C. McKaigney, H. Jijon, C. Yachimec, J. Doyle, L. Jewell and C. De Simone (2001). "Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function." *Gastroenterology* 121(3): 580-591.

Mahaut, M., R. Jeantet, G. Brulé and P. Schuck (2000). *Industrial milk products*, Editions Tec & Doc.

Mainville, I., Y. Arcand and E. R. Farnworth (2005). "A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics." *International Journal of Food Microbiology* 99(3): 287-296.

Malagelada, J. R., E. P. DiMagno, W. H. Summerskill and V. L. Go (1976). "Regulation of pancreatic and gallbladder functions by intraluminal fatty acids and bile acids in man." *J Clin Invest* 58(2): 493-499.

Malagelada, J. R., G. F. Longstreth, W. H. Summerskill and V. L. Go (1976). "Measurement of gastric functions during digestion of ordinary solid meals in man." *Gastroenterology* 70(2): 203-210.

Malagelada, J.-R., V. W. Go and W. H. J. Summerskill (1979). "Different gastric, pancreatic, and biliary responses to solid-liquid or homogenized meals." *Digestive Diseases and Sciences* 24(2): 101-110.

Marciani, L., D. Bush, P. Wright, M. Wickham, B. Pick, J. Wright, R. Faulks, A. Fillery-Travis, R. C. Spiller and P. A. Gowland (2005). "Monitoring of gallbladder and gastric coordination by EPI." *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 21(1): 82-85.

Marciani, L., M. S. J. Wickham, D. Bush, R. Faulks, J. Wright, A. J. Fillery-Travis, R. C. Spiller and P. A. Gowland (2006). "Magnetic resonance imaging of the behaviour of oil-in-water emulsions in the gastric lumen of man." *British Journal of Nutrition* 95(02): 331-339.

Mercuri, A., A. Lo Curto, M. S. J. Wickham, D. Q. M. Craig and S. A. Barker (2008). "Dynamic gastric model (DGM): a novel in vitro apparatus to assess the impact of gastric digestion on the droplet size of self-emulsifying drug-delivery systems." *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 60: A2-A2.

Minekus, M. (1995). "A multi-compartmental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and small intestine." *Alternatives to Laboratory Animals (ATLA)* 23: 197-209.

Minekus, M., M. Alminger, P. Alvito, S. Ballance, T. Bohn, C. Bourlieu, F. Carriere, R. Boutrou, M. Corredig, D. Dupont, C. Dufour, L. Egger, M. Golding, S. Karakaya, B. Kirkhus, S. Le Feunteun, U. Lesmes, A. Macierzanka, A. Mackie, S. Marze, D. J. McClements, O. Menard, I. Recio, C. N. Santos, R. P. Singh, G. E. Vegarud, M. S. J. Wickham, W. Weitschies and A. Brodkorb (2014). "A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus." *Food & Function* 5(6): 1113-1124.

Minekus, M., M. Smeets-Peeters, A. Bernalier, S. Marol-Bonnin, R. Havenaar, P. Marteau, M. Alric, G. Fonty and J. H. J. Huis in't Veld (1999). "A computer-controlled system to simulate conditions of the large intestine with peristaltic mixing, water absorption and absorption of fermentation products." *Applied Microbiology and Biotechnology* 53(1): 108-114.

Molly, K., M. Woestyne and W. Verstraete (1993). "Development of a 5-step multi-chamber reactor as a simulation of the human intestinal microbial ecosystem." *Applied Microbiology and Biotechnology* 39(2): 254-258.

Montel, M.-C., S. Buchin, A. Mallet, C. I. Delbes-Paus, D. A. Vuitton, N. Desmasures and F. o. Berthier (2014). "Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits." *International journal of food microbiology* 177: 136-154.

Mounier, J. m., R. Gelsomino, S. Goerges, M. Vancanneyt, K. Vandemeulebroecke, B. Hoste, S. Scherer, J. Swings, G. F. Fitzgerald and T. M. Cogan (2005). "Surface Microflora of Four Smear-Ripened Cheeses." *Applied and Environmental Microbiology* 71(11): 6489-6500.

Mounier, J., C. Monnet, T. Vallaeys, R. Arditi, A. S. Sarthou, A. Helias and F. Irlinger (2008). "Microbial interactions within a cheese microbial community." *Appl Environ Microbiol* 74(1): 172-181.

Nelson, D., L., and Cox, M., M. (2008) "Lehninger Principles of Biochemistry" ed. San Francisco: W.H. Freeman. 5th edition ISBN 0-7167-7108-X. 1100 p

- Noguchi, K., D. P. Riggins, K. C. Eldahan, R. D. Kitko and J. L. Slonczewski (2010). "Hydrogenase-3 Contributes to Anaerobic Acid Resistance of *Escherichia coli*." *PLoS ONE* 5(4): e10132.
- Nunes, A., I. Correia, A. n. Barros and I. Delgadillo (2004). "Sequential in Vitro Pepsin Digestion of Uncooked and Cooked Sorghum and Maize Samples." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(7): 2052-2058.
- Ouwehand, A. C., F. Ibrahim and S. D. Forssten (2010). "Cheese as a carrier for probiotics: in vitro and human studies." *Australian journal of dairy technology* 65(3): 165-169.
- Parvez, S., K. A. Malik, S. Ah Kang and H. Y. Kim (2006). "Probiotics and their fermented food products are beneficial for health." *Journal of Applied Microbiology* 100(6): 1171-1185.
- Payne, A. N., A. Zihler, C. Chassard and C. Lacroix (2012). "Advances and perspectives in in vitro human gut fermentation modeling." *Trends in Biotechnology* 30(1): 17-25.
- Plé, C., N. Adouard, J. Breton, J. Dewulf, B. Pot, P. Bonnarme and B. Foligné (2014). "Designing specific cheese-ripening ecosystems to shape the immune effects of dairy products?" *Journal of Functional Foods* 12(0): 219-229.
- Pot, B., Foligné, B., Daniel, C., & Grangette, C. (2013) "Understanding Immunomodulatory Effects of Probiotics". In : *The Importance of Immunonutrition*. Edited by Makrides M., Ochoa J.B., Szajewska H. Nestlé Nutrition Institute Workshop Series. Nestec Ltd. Vevey/S. Karger AG Basel, Year 2013, vol 77, pp 75-90, ISSN: 1664-2147 (Print), eISSN: 1664-2155 (Online)
- Prouty, A. M., J. C. Van Velkinburgh and J. S. Gunn (2002). "Salmonella enterica serovar Typhimurium resistance to bile: identification and characterization of the tolQRA cluster." *Journal of bacteriology* 184(5): 1270-1276.
- Ramasamy, K., N. Abdullah, M. C. V. L. Wong, C. Karuthan and Y. W. Ho (2009). "Bile salt deconjugation and cholesterol removal from media by *Lactobacillus* strains used as probiotics in chickens." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90(1): 65-69.
- Requena, J. M. (2012). *Stress Response in Microbiology*, Horizon Scientific Press.
- Ricciardi, A., G. Blaiotta, A. Di Cerbo, M. Succi and M. Aponte (2014). "Behaviour of lactic acid bacteria populations in Pecorino di Carmasciano cheese samples submitted to environmental conditions prevailing in the gastrointestinal tract: Evaluation by means of a polyphasic approach." *International Journal of Food Microbiology* 179(0): 64-71.
- Saarela, M., G. Mogensen, R. Fondän, J. Mättää and T. Mattila-Sandholm (2000). "Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties." *Journal of Biotechnology* 84(3): 197-215.
- Salaun, F., B. Mietton and F. Gaucheron (2005). "Buffering capacity of dairy products." *International Dairy Journal* 15(2): 95-109.
- Salque, M., P. I. Bogucki, J. Pyzel, I. Sobkowiak-Tabaka, R. Grygiel, M. Szmyt and R. P. Evershed (2012). "Earliest evidence for cheese making in the sixth millennium bc in northern Europe." *Nature advance online publication*.

- Saxelin, M., A. Lassig, H. Karjalainen, S. Tynkkynen, A. Surakka, H. Vapaatalo, S. Järvenpää, R. Korpela, M. Mutanen and K. Hatakka (2010). "Persistence of probiotic strains in the gastrointestinal tract when administered as capsules, yoghurt, or cheese." *International Journal of Food Microbiology* 144(2): 293-300.
- Schricker, B. R., D. D. Miller, R. R. Rasmussen and D. Van Campen (1981). "A comparison of in vivo and in vitro methods for determining availability of iron from meals." *The American Journal of Clinical Nutrition* 34(10): 2257-63.
- Schwizer, W., H. Maecke and M. Fried (1992). "Measurement of gastric emptying by magnetic resonance imaging in humans." *Gastroenterology* 103(2): 369-376.
- Seong, A. C., K. Kee-Sung and L. Sang-Dong (2012). "Effects of Mozzarella cheese manufactured by *S. macedonicus* LC743 on the immune status of mouse." *Korean Journal for Food Science of Animal Resources* 32(1): 40-44.
- Sharp, M. D., D. J. McMahon and J. R. Broadbent (2008). "Comparative Evaluation of Yogurt and Low-Fat Cheddar Cheese as Delivery Media for Probiotic *Lactobacillus casei*." *Journal of Food Science* 73(7): M375-M377.
- Slonczewski, J. L., M. Fujisawa, M. Dopson and T. A. Krulwich (2009). "Cytoplasmic pH measurement and homeostasis in bacteria and archaea." *Adv Microb Physiol* 55: 1-79, 317.
- Smith, M. E. and D. G. Morton (2010). *The Digestive System: Basic Science and Clinical Conditions*, Churchill Livingstone.
- Souliman, S., S. p. Blanquet, E. Beyssac and J.-M. Cardot (2006). "A level A in vitro/in vivo correlation in fasted and fed states using different methods: Applied to solid immediate release oral dosage form." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 27(1): 72-79.
- Stiles, M. E. and W. H. Holzapfel (1997). "Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy." *International Journal of Food Microbiology* 36(1): 1-29.
- Timm, D., H. Willis, W. Thomas, L. Sanders, T. Boileau and J. Slavin (2011). "The use of a wireless motility device (SmartPill (R)) for the measurement of gastrointestinal transit time after a dietary fibre intervention." *British Journal of Nutrition* 105(9): 1337-1342.
- Turgeon, S. L. and L.-E. Rioux (2011). "Food matrix impact on macronutrients nutritional properties." *Food Hydrocolloids* 25(8): 1915-1924.
- Upreti, P., P. Bühlmann and L. E. Metzger (2006). "Influence of Calcium and Phosphorus, Lactose, and Salt-to-Moisture Ratio on Cheddar Cheese Quality: pH Buffering Properties of Cheese." *Journal of Dairy Science* 89(3): 938-950.
- Van den Abbeele, P., C. Grootaert, M. Marzorati, S. Possemiers, W. Verstraete, P. Gérard, S. Rabot, A. Bruneau, S. El Aidy, M. Derrien, E. Zoetendal, M. Kleerebezem, H. Smidt and T. Van de Wiele (2010). "Microbial Community Development in a Dynamic Gut Model Is Reproducible, Colon Region Specific, and Selective for Bacteroidetes and Clostridium Cluster IX." *Applied and Environmental Microbiology* 76(15): 5237-5246.

van den Bogert, B., W. M. de Vos, E. G. Zoetendal and M. Kleerebezem (2011). "Microarray Analysis and Barcoded Pyrosequencing Provide Consistent Microbial Profiles Depending on the Source of Human Intestinal Samples." *Applied and Environmental Microbiology* 77(6): 2071-2080.

Venema, K., R. Havenaar and M. Minekus (2009). Improving in vitro simulation of the stomach and intestines. In : *Designing functional foods: measuring and controlling food structure breakdown and nutrient absorption*. Ed. MacClements, J. & Decker, E., A. Woodhead Publishing pp 314-339. ISBN 9781845694326

Vermeiren, J., P. Van den Abbeele, D. Laukens, L. K. Vigsnaes, M. De Vos, N. Boon and T. Van de Wiele (2011). "Decreased colonization of fecal *Clostridium coccoides*/*Eubacterium rectale* species from ulcerative colitis patients in an in vitro dynamic gut model with mucin environment." *FEMS Microbiology Ecology* 79(3): 685-696.

Versantvoort, C. H. M., A. G. Oomen, E. Van de Kamp, C. J. M. Rompelberg and A. n. J. A. M. Sips (2005). "Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food." *Food and Chemical Toxicology* 43(1): 31-40.

Wickham, M. J. S., R. M. Faulks, J. Mann and G. Mandalari (2012). "The Design, Operation, and Application of a Dynamic Gastric Model." *Dissolution Technologies* 19(3): 15-22.

Woda, A., A. Mishellany-Dutour, L. Batier, O. François, J. P. Meunier, B. Reynaud, M. Alric and M. A. Peyron (2010). "Development and validation of a mastication simulator." *Journal of Biomechanics* 43(9): 1667-1673.

Wolfe, B. E., J. E. Button, M. Santarelli and R. J. Dutton (2014). "Cheese rind communities provide tractable systems for in situ and in vitro studies of microbial diversity." *Cell* 158(2): 422-433.

Zangerberg, N. H. n., A. Mällertz, H. G. Kristensen and L. Hovgaard (2001). "A dynamic in vitro lipolysis model: I. Controlling the rate of lipolysis by continuous addition of calcium." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 14(2): 115-122.

Sites Internet et Autres

Base de données Brenda enzyme. Entrée Pepsine EC 3.4.4.1

<http://www.brenda-enzymes.info/enzyme.php?ecno=3.4.23.1> [en ligne] Consultée le 09/12/2014

CNIEL : L'économie Laitière en Chiffres (2013) - <http://fr.calameo.com/read/002230051d0c12dffc73>
[en ligne] Consulté le 09/12/2014

Codex Alimentarius, Norme CODEX STAN A-6-1973. Adopté en 1973. Révision 1999. Amendé en 2006, 2008, 2013. http://www.codexalimentarius.org/input/download/standards/175/CXS_283f.pdf.
[en ligne]. Consulté le 09/12/2014

Eurostat "Milk and Dairy Production statistics"

http://epp.eurostat.ec.europa.eu/statistics_explained/index.php/Milk_and_dairy_production_statistics [en ligne]. consulté le 09/12/2014

FAO/WHO experts (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Geneva, Switzerland : Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report. p. 1-11. <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>. [enligne] consulté le 09/12/2014

RIVM report 320102002/2004 "Development and applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of contaminants from food" - CHM Versantvoort, E van de Kamp, CJM Rompelberg
<http://rivm.openrepository.com/rivm/bitstream/10029/8885/1/320102002.pdf> [en ligne] consulté le 09/12/2014.

- Annexes -

Table des matières des annexes

ANNEXE I – Principe de Fonctionnement du DIDGI.....	212
ANNEXE II – Protocole détaillé colites.....	232
ANNEXE III – Posters.....	233
ANNEXE IV – Article 3 publié dans Journal of Functional Foods.....	235

 Unité 0782 LGMPA	Instruction	Réf. : Version 2 Date de création : 02/10/2012 page 211/18
	Utilisation du Digesteur	

Objet :

Présentation du Digesteur Dynamique Gastro-Intestinal (DIDGI) et de son utilisation.

Exécutants :

Toute personne ayant reçu une formation sur le digesteur

Documents et/ou informations et/ou matériels nécessaires :

Liste des documents ou informations ou matériels : Disponibles auprès de :

- | | |
|--|--------------|
| ◆ Fiche Instruction Préparation Solutions | ◆ Silverpeas |
| ◆ Mode opératoire Viabilité Probiotiques | ◆ Silverpeas |
| ◆ Mode opératoire Viabilité Flore d'affinage | ◆ Silverpeas |
| ◆ Mode opératoire Emulsion Huile/Protéines | ◆ Silverpeas |
| ◆ MEGE_2012_Digesteur-Essais.xlsx | ◆ Silverpeas |
| ◆ MEGE_2012_Digesteur-RisquesGénéraux.xlsx | ◆ Silverpeas |
| ◆ RisquesDigesteur.docx | ◆ Silverpeas |

Conditions et/ou contraintes à respecter :

- ◆ Utilisation de 2 réacteurs en verre → à manipuler avec précaution
- ◆ Utilisation de 2 sondes pH → à manipuler avec précaution
- ◆ Utilisation d'HCl et de Na₂CO₃ → manipuler en utilisant des gants et des lunettes de protection
- ◆ Utilisation de solutions enzymatiques et de produit alimentaire
- ◆ Utilisation de micro-organismes
- ◆ Utilisation d'éthanol et de bec bunsen

Documents et/ ou informations et/ou matériels à transmettre :

Liste des documents ou informations ou matériels : A transmettre à :

◆ Remplir le cahier de laboratoire, remplir la fiche de manip, remplir la fiche de suivi de l'appareil

◆ Cahier de laboratoire disponible à côté du digesteur

◆

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	Thomas Cattenoz	Laurent Magne	Nadège Adouard
Fonction :	TR	Stagiaire	Doctorante
Visa :	TC	LM	NA

 Unité 0782 LGMPA	Instruction	Réf. : Version 2 Date de création : 02/10/2012 page 212/18
	Utilisation du Digesteur	

◆

Conduite à tenir face aux problèmes principaux :

Problèmes :

- ◆ Attention lors de la manipulation des réacteurs (lourd et fragile)
- ◆ Attention en manipulant les sondes pH (fragiles)
- ◆ Attention aux risques de non communication du logiciel avec le coffret de transmission

Conduite à tenir :

- ◆
- ◆
- ◆ Fermer le logiciel, éteindre le coffret puis le rallumer et relancer le logiciel
- ◆ Attention aux problèmes de communication entre logiciel et sondes pH (erreur G ou D = 1)
- ◆ Eteindre le logiciel et le relancer
- ◆ ou éteindre le logiciel, déconnecter la prise USB du transmetteur pH et la reconnecter puis relancer le logiciel
- ◆ ou éteindre le logiciel, lancer hyperterminal, vérifier que les sondes communiquent avec le PC, fermer hyperterminal et relancer le logiciel

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	Thomas Cattenoz	Laurent Magne	Nadège Adouard
Fonction :	TR	Stagiaire	Doctorante
Visa :	TC	LM	NA

PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT

Le Digesteur Dynamique GastroIntestinal (DIDGI) permet de mimer la digestion en condition dynamique et de contrôler les divers apports (enzymes, HCl, bile,...), ainsi que le transfert entre compartiments. L'appareil permet aussi une régulation de la température, de l'agitation et du pH par l'intermédiaire de capteurs et d'une interface de contrôle informatique.

Des mesures de d'oxygène dissous et gazeux sont possibles.

Le dispositif est stérilisable et permet des tests de viabilité de micro-organismes.

DESCRIPTION DU DIDGI

Photo du dispositif

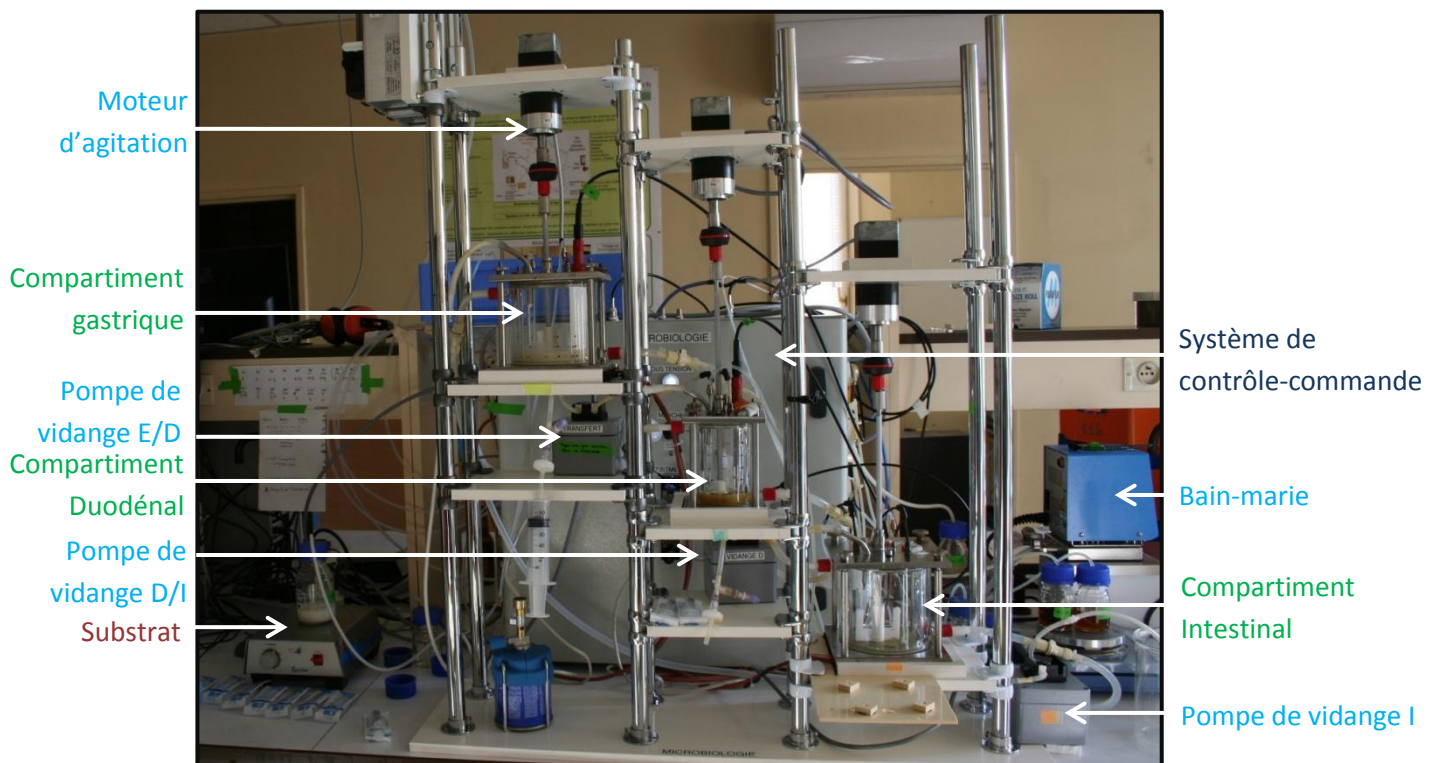
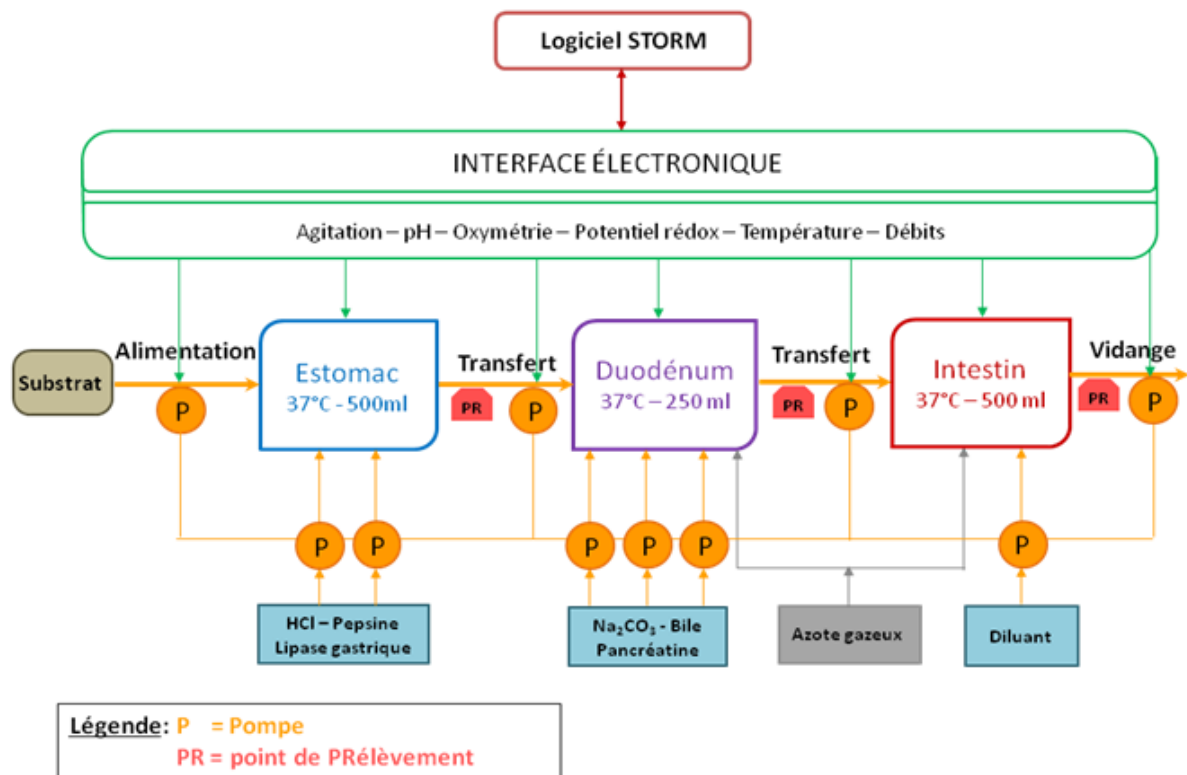


Schéma de principe

Description et fonctionnement du système DIDGI

Chaque compartiment est constitué d'un **réacteur en verre** à double enveloppe.

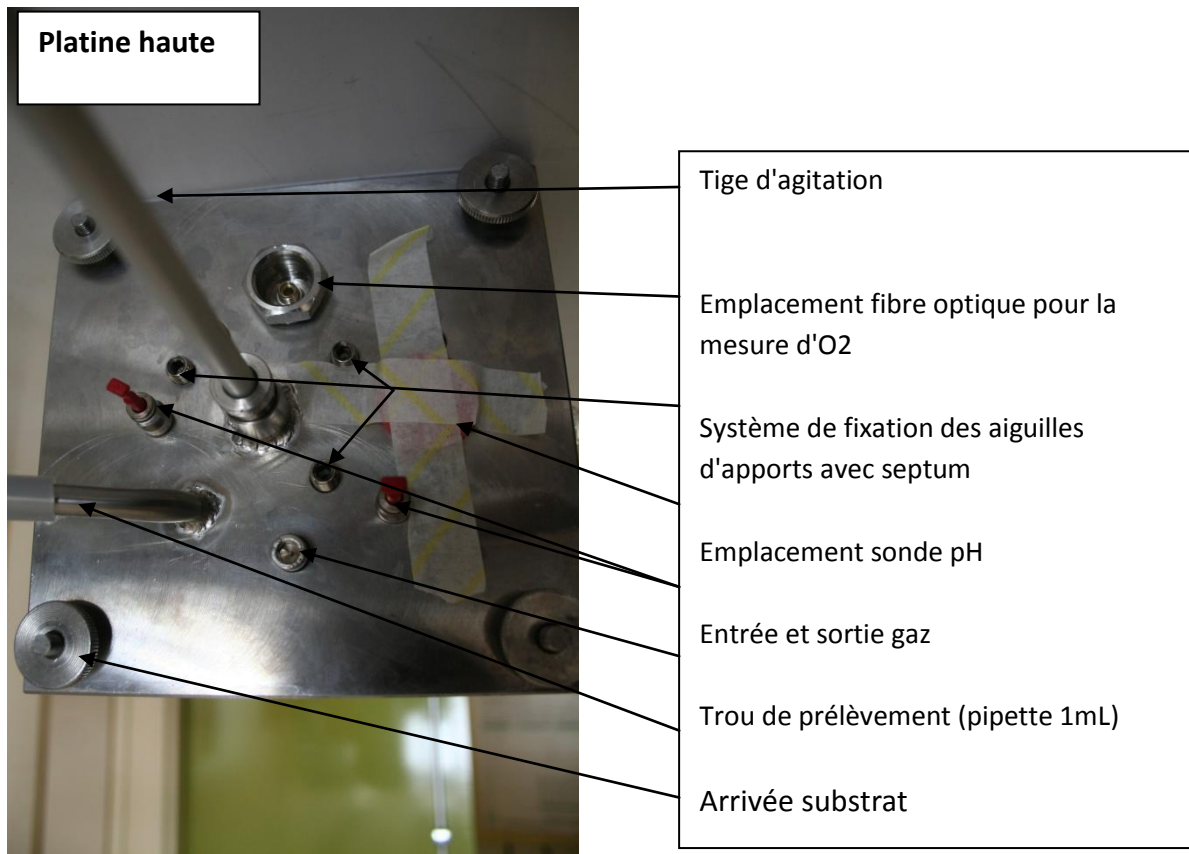


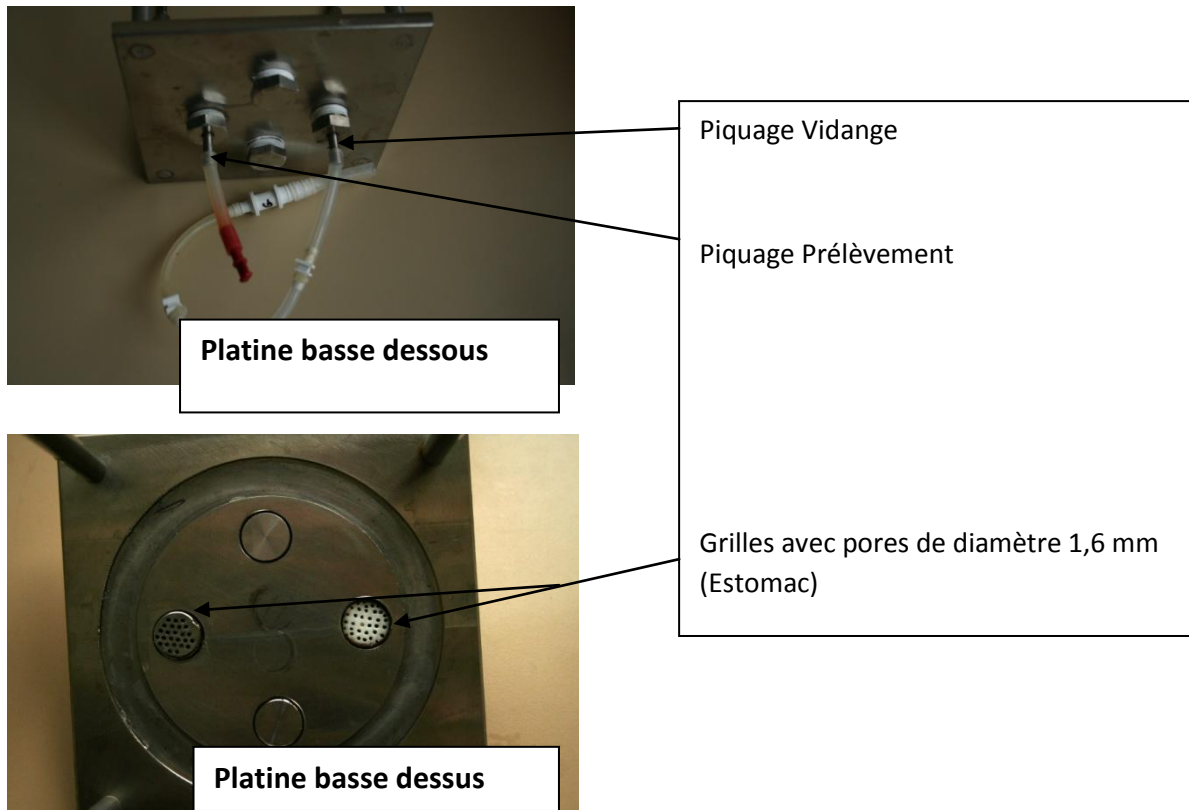
Les doubles enveloppes des réacteurs sont reliées en série afin d'assurer une circulation d'eau provenant du bain marie et permettant la régulation en température du système.

Le volume des réacteurs stomacal et intestinal est de 1000 mL.

Le réacteur duodénal a un volume de 300 mL.

Les réacteurs sont fermés par une **platine haute** et une **platine basse** en inox.





Ces platines sont épaisses et il est nécessaire de chauffer la platine du fond pour avoir un maintien satisfaisant de la température du réacteur.

Le réchauffement de la platine est assuré par un **tapis chauffant**.



Les platines basses possèdent des piquages permettant de connecter les tuyaux des

pompes de vidange



et de réaliser des prélèvements.

Sur le piquage de vidange de l'estomac, une **grille** dont les pores ont un diamètre de 1,6 mm permet de sélectionner les particules passant dans le duodénum. Ce diamètre a été établi d'après le diamètre d'ouverture du pylore lorsque l'estomac est rempli [REF#].

Des piquages particuliers permettent également de positionner une **fibre optique** (système OXY4 de chez Presens) dont le faisceau lumineux excite un **spot**

en contact avec le milieu.



La réponse de ce permet une mesure de l'oxygène : **oxygène dissout** pour la pastille en contact avec la partie basse du réacteur, **oxygène gazeux** pour la pastille en contact avec la partie haute.

Les platines inox du haut possèdent des **septums** dans lesquels l'utilisateur plante les **aiguilles** d'apport en enzymes, acide, base ou bile.

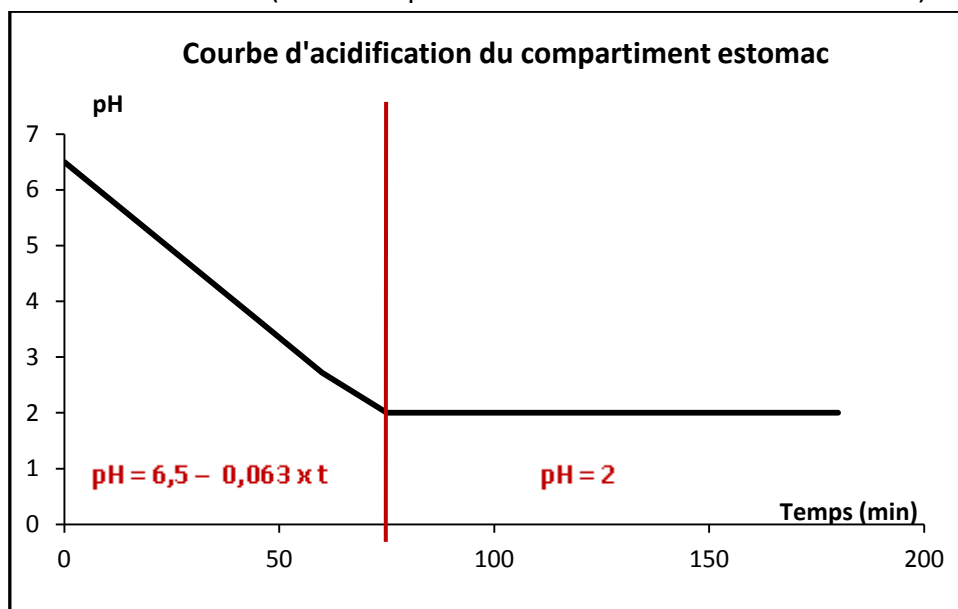
Deux piquages permettent de faire circuler un gaz dans l'espace de tête du réacteur. Ainsi, de l'**azote** est injecté dans le duodénum et dans l'intestin afin de créer des conditions d'**anoxie** dans ces deux compartiments.

D'une façon générale, une **matrice alimentaire** et de la **salive** sont introduites dans l'**estomac** par une pompe (péristaltique ou piston).

De la **pepsine** et de la **lipase gastrique** sont également apportées en continu pendant toute la durée de la phase gastrique.

Dans ce même compartiment, le **pH**, la **température** et le **potentiel redox** sont mesurés par une **sonde** (Mettler Todedo Inpro4801i/SG/120).

En début d'essai, lorsque le volume total introduit dans l'estomac devient supérieur à 30 mL, la sonde pH effectue une mesure correcte. La **régulation du pH** se met alors en place. La pompe acide est sollicitée et le pH est amené à des valeurs proches de 2 en suivant une courbe d'acidification définie (voir exemple de courbe d'acidification ci-dessous).



Se met en place également la **régulation de la température** de la platine basse de façon à ce que la sonde de température associée à la sonde pH donne une valeur de 37°C dans le milieu.

En début d'essai, lorsque la sonde n'est pas encore immergée, la régulation de la température de la platine se fait grâce à la sonde de température qui est associée au tapis chauffant.

La régulation de température du duodénum se passe de la même façon.

Pour le compartiment intestinal, il n'y a pas de sonde pH/température/redox. La régulation de température de la platine se fait uniquement par la sonde de température du tapis chauffant.

Le milieu contenu dans l'estomac passe par le filtre présent sur la platine du fond du réacteur puis est introduit dans le **duodénum** via une pompe de vidange.

Physiologiquement, chez l'homme, le duodénum est très petit, environ 20-30 cm. Dans ce compartiment, de la **bile** et de la **pancréatine** sont ajoutées au chyme. Le pH est remonté à 6.5 par l'apport d'une base (Na_2CO_3). Le duodénum est un lieu de transit, aussi, dans le DIDGI, le volume du compartiment duodénal est maintenu à 50 mL. Pendant toute la durée de la phase stomacale et jusqu'à ce que le volume restant dans l'estomac soit inférieur à 50 mL, le volume vidangé du duodénum est égal à la somme des apports effectués dans ce même compartiment.

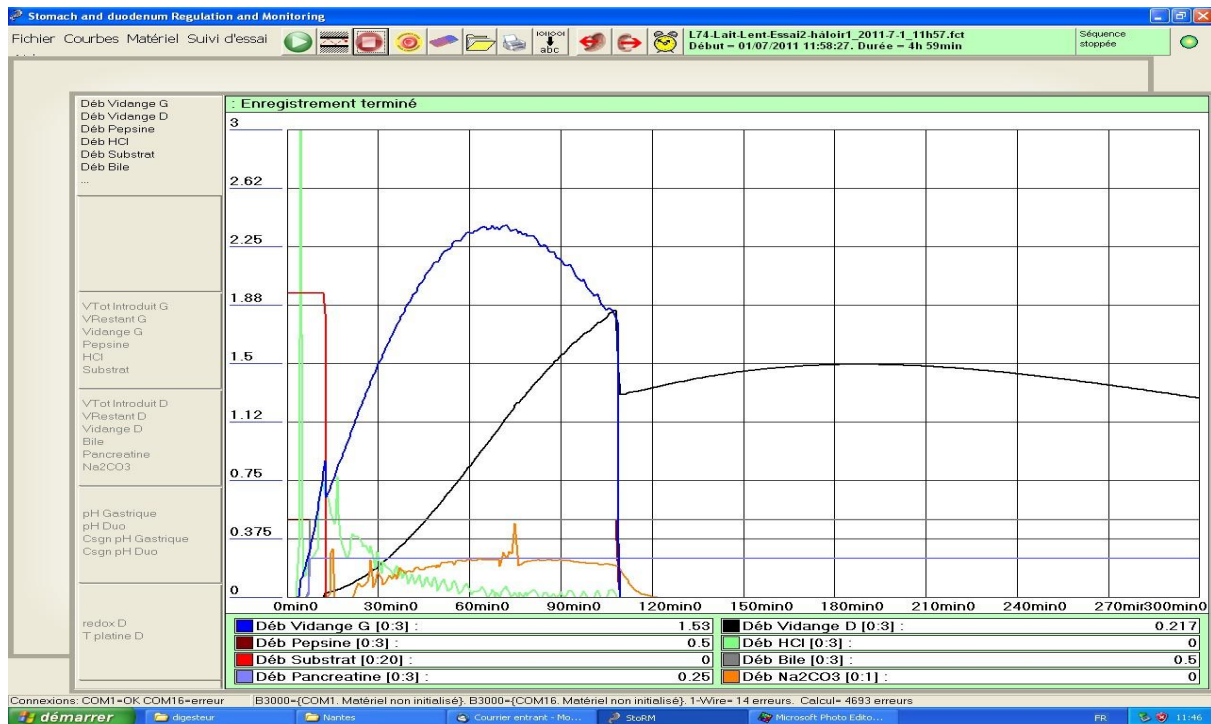
Ensuite, l'estomac et le duodénum se vidangent à la même vitesse jusqu'à la fin de l'essai.

Le dernier compartiment, l'**intestin**, mime l'absorption des nutriments à travers la paroi intestinale par une dilution du milieu. Cette dilution se fait par un apport d'**eau peptonée**.

En cours d'essai, l'utilisateur a la possibilité de réaliser des prélèvements d'échantillons, soit par la platine du haut, soit par la platine du bas.

Paramétrage de la digestion

L'appareil est piloté par le logiciel **STORM**.



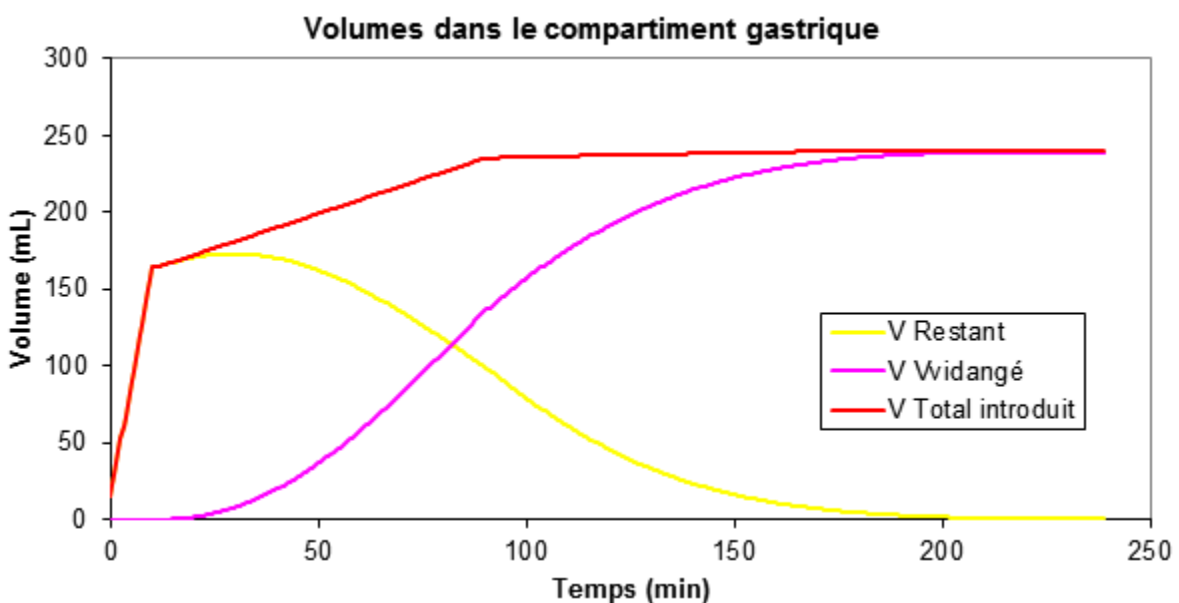
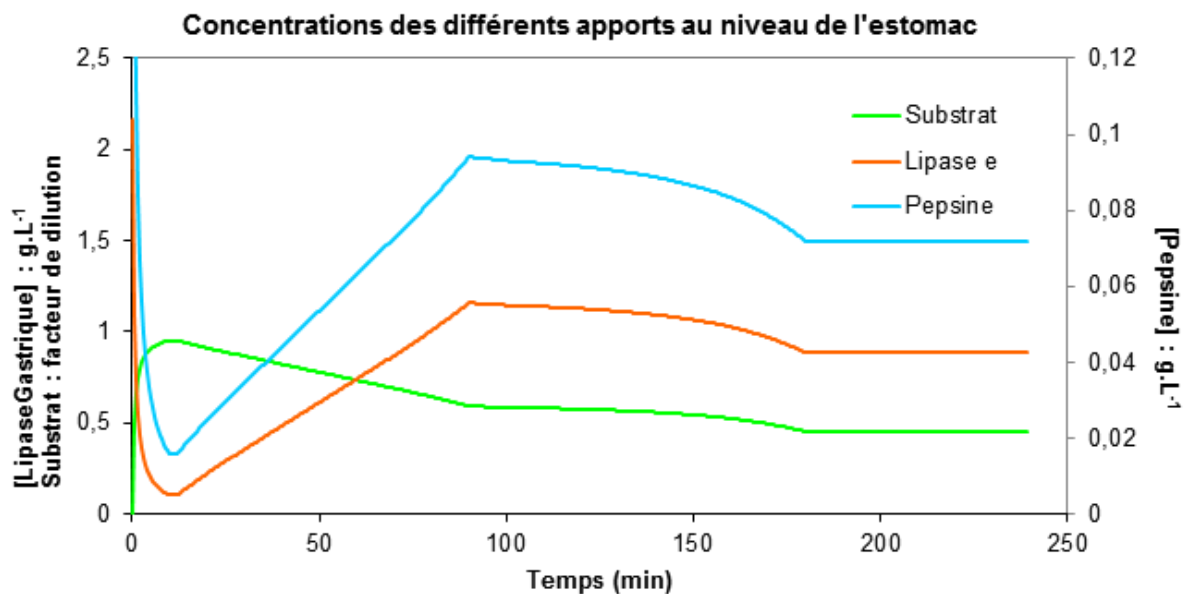
Le logiciel permet:

- l'enregistrement et la visualisation des données mesurées par les capteurs (pH, redox, température, pO₂),
- l'étalonnage des capteurs,
- la commande des actionneurs: pompes d'apport d'enzymes, pompes de vidange des compartiments, pompes de régulation du pH, tapis chauffants, moteurs d'agitation,
- l'enregistrement et la visualisation des débits et volumes délivrés par les pompes,
- le calcul des volumes introduits, vidangés et restants, pour chaque compartiment,
- l'indication des volumes de milieu prélevés en cours d'essai,
- l'exportation des données d'un essai au format .TXT afin de les reprendre sous un tableur type EXCEL.

L'ensemble des étapes d'un essai est reporté dans un fichier "séquence" que l'utilisateur doit paramétrer. **Se référer aux modes opératoire "séquence"**.

Afin de régler ces paramètres, un logiciel de simulation est à disposition (SIMU.XLS). Ce logiciel permet notamment de définir les profils de concentration des différents apports (enzymes, substrat) au cours de l'essai, ainsi que les profils de vidange des compartiments.

Les graphiques ci-dessous présentent l'évolution des concentrations et des volumes dans le compartiment gastrique. Le même type de graphique est donné par le logiciel de simulation pour le duodénum et l'intestin.



Ci-dessous est présenté un exemple de tableau récapitulant les temps d'action et les débits des pompes pour une application spécifique (digestion de micro-organismes).

Solution introduite	Compartiment	Vi(mL)	Débit(mL.min ⁻¹)	Début (min)	Fin (min)
Substrat + Salive	Gastrique	100 + 50	15	0	10
Pepsine (0,5 g.L ⁻¹)	Gastrique	0	0,40	10	90
Lipase gastrique (6,5 g.L ⁻¹)					
HCl 1M (régulation pH)	Gastrique	-	-	V _G >40 mL	V _G < 40 mL
Pancréatine (20 g.L ⁻¹)	Duodéal	0	0,25	12	50
			0,10	50	130
Bile (40 g.L ⁻¹)	Duodéal	0	0,50	12	80
			0,15	80	130
Bile (20 g.L ⁻¹)	Duodéal	0	0,20	90	130
Na ₂ CO ₃ 1M (régulation pH)	Duodéal	0		V _D >20 mL	V _D <20 mL
Diluant (eau peptonée)	Intestin	0	0,8	20	100
			0,5	100	230

L'utilisateur doit paramétrer également l'allure des courbes de vidange.

Le transit du chyme suit une loi de puissance comme décrit par Elashoff et al. (1982):

$$f = 1 - 2^{-\left(\frac{t}{t_{1/2}}\right)^\beta}$$

f représente la fraction vidangée, **t_{1/2}** le temps de demi vidange, **t** le temps et **β** une constante décrivant la forme de la courbe.

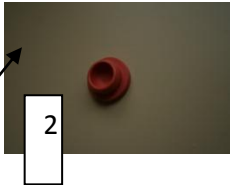
Ces paramètres sont fonction du type d'aliment introduit dans l'appareil conditionnant une digestion lente ou rapide (voir exemple ci-dessous).

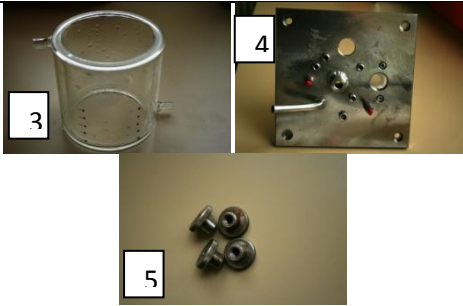
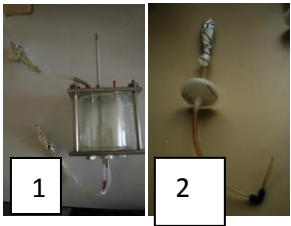
t _{1/2} (min)	Digestion rapide	Digestion lente
Vidange gastrique (β=1.9)	40	70
Vidange duodéal (β=1.6)	85	160

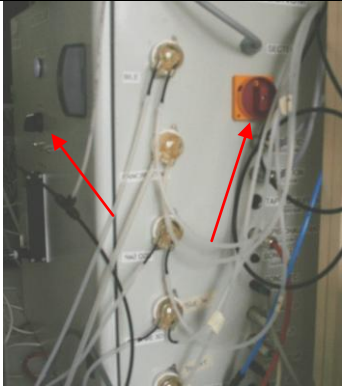
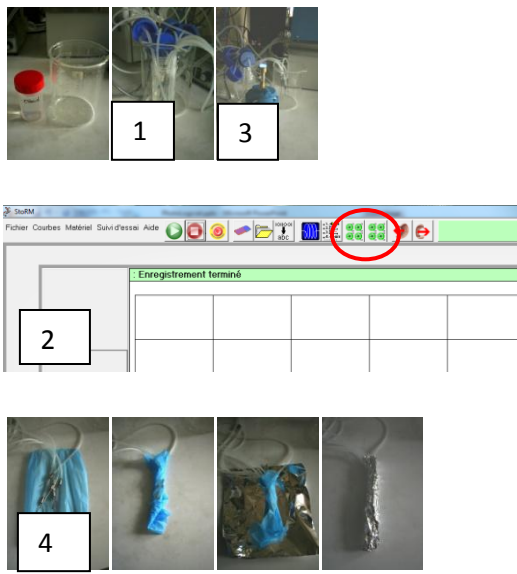
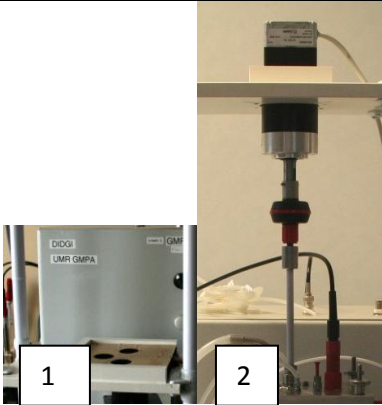
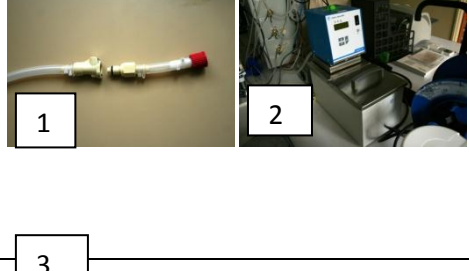
Matériel et réactifs

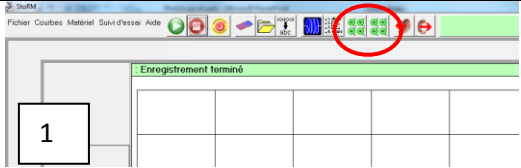
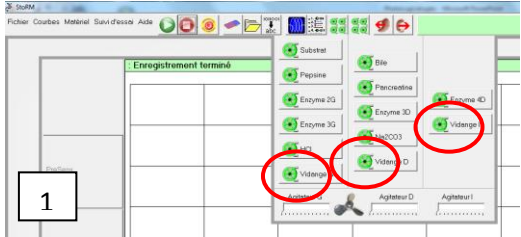
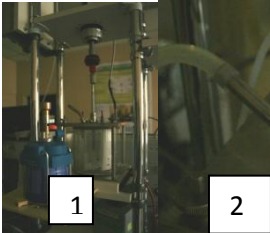
Se reporter au mode opératoire spécifique de l'essai à réaliser pour la préparation du matériel et des réactifs.

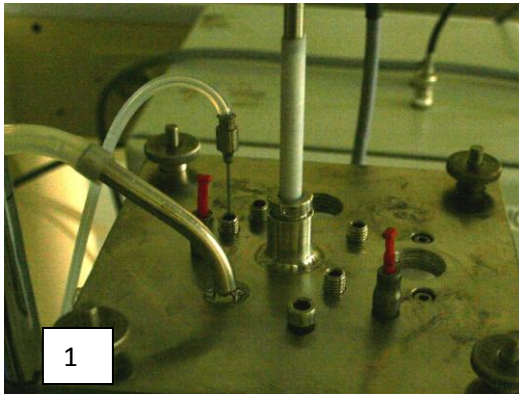
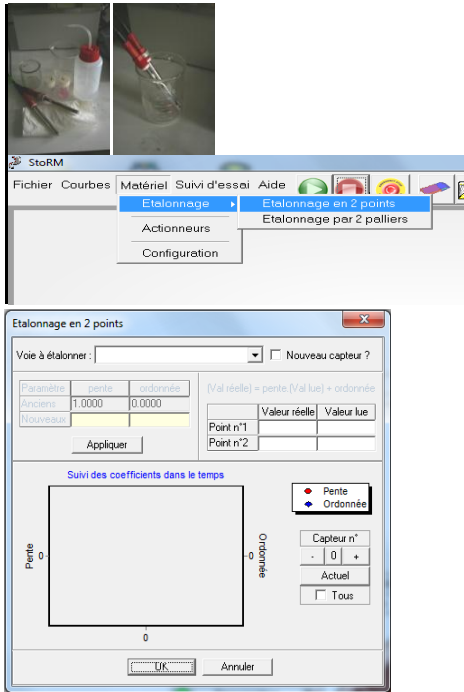
PRINCIPALES ETAPES D'UNE DIGESTION

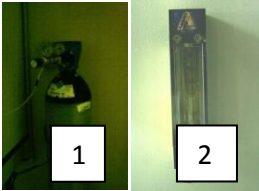
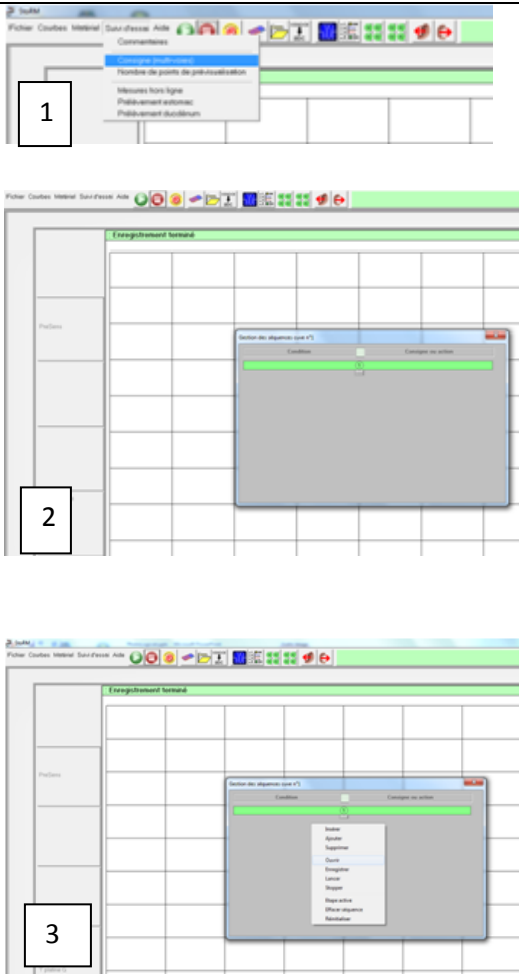
PRINCIPALES ETAPES	AVEC QUOI ?	QUELS ENREGISTREMENTS ?
1 – Préparation des platines du dessus des réacteurs (J-1)	Vérifier que la tige d'agitation est en place sur la platine, si ce n'est pas le cas, mettre en place la tige d'agitation. Vérifier l'état des septums, si besoin, les changer (1). Mettre en place un septum (2) sur les emplacements destinés à la sonde pH et à une éventuelle autre sonde (estomac et intestin). Vérifier que les connecteurs Legris sont bouchés pour la platine de l'estomac (bouchons Legris rouges). Pour le duodénum et l'intestin, placer un filtre sur chaque connecteur Legris (un dans le sens "in", l'autre dans le sens "out") (3). Mettre en place un morceau de tuyau (environ 10cm) sur l'arrivée de milieu.	    
2 – Préparation des platines du fond des réacteurs (J-1)	Placer un bouchon (tuyau+bouchon Legris rouge) sur la sortie prélèvement (piquage du devant de la platine) et placer le tuyau de vidange du réacteur sur la sortie vidange (piquage du fond de la platine).	
3 – Montage des réacteurs (J-1)	Positionner la platine du bas (1) sur un bécher plastique. <i>Platine basse intestin avec sortie milieu coté utilisateur.</i> Placer le joint "inférieur" (2) puis installer le bol en verre (3). L'entrée de la double enveloppe est positionnée coté bain-marie.	 

	Placer la platine du dessus (4) sur le bol, avec le joint (2). L'entrée milieu est positionnée à gauche. Serrer les vis de fixation (5).	
4 – Bouchage des tuyaux pour la stérilisation (J-1)	Placer du coton cardé et de la gaz sur les entrées milieu des réacteurs et sur les tuyaux de vidange. Entourer l'ensemble avec du papier aluminium et scotcher avec du scotch autoclave. Procéder de la même façon pour les embout des tuyaux d'arrivée et de sortie de gaz (duodénum et intestin).	
5 – Visualisation des réacteurs avant autoclavage (J-1)	Est présenté ci-contre une photo de l'estomac avant autoclavage (1). Pour le duodénum et l'intestin, les bouchons Legris des entrées et sorties gaz sont remplacés par les tuyaux additionnés des filtres 0.22 µm (2).	
6 – Préparation des systèmes de prélèvement (J-1)	Sur les compartiments gastrique et duodénal, un système de prélèvement est positionné avant l'essai de digestion. Ce système de prélèvement doit être autoclavé en même temps que les réacteurs. Placer le système de prélèvement dans du papier aluminium et fermer avec un morceau de scotch autoclave.	
7 – Autoclavage (J-1)	Placer les réacteurs, les systèmes de prélèvement et le matériel (bouteilles d'eau,...) nécessaires à l'expérimentation dans l'autoclave. Autoclaver 20 minutes à 120°C.	

8 – Mise en route du système (J-1)	Allumer le coffret Allumer l'ordinateur Lancer le logiciel STORM	
9 – Stérilisation des tuyaux d'apport (J-1)	Placer les entrées et sorties des tuyaux des pompes dans un flacon d'éthanol (1). Faire tourner les pompes environ 15 minutes. Cliquer sur les icônes présentées ci-contre et sélectionner les pompes que l'on souhaite actionner (2). Plonger les entrées des tuyaux dans un flacon d'eau stérile avec un bec bunsen allumé à proximité (3). Placer les sorties des tuyaux sur un béccher propre que l'on a essuyé avec une lingette désinfectante. Faire tourner les pompes environ 15 minutes. Retirer les entrées des tuyaux des pompes du flacon d'eau et vidanger les tuyaux. Arrêter les pompes Placer les entrées et sorties dans une lingette désinfectante et entourer de papier aluminium (4)	
10 – Positionnement des réacteurs sur les supports (J)	Mettre en place les réacteurs sur les supports en faisant passer les tuyaux de vidange et de prélèvement dans les trous des tapis chauffants et des supports (1). Connecter les axes d'agitation aux moteurs (2).	
11 – Mise en route du circuit d'eau des doubles enveloppes (J)	A l'aide du raccord rapide (1), connecter la sortie d'eau du bain-marie (2) sur l'entrée d'eau de la double enveloppe de l'intestin (bas de la double enveloppe) (3). Connecter la sortie d'eau de la double enveloppe	

	de l'intestin (haut de la double enveloppe) sur l'entrée d'eau de la double enveloppe du duodénum. Connecter la sortie d'eau de la double enveloppe du duodénum sur l'entrée d'eau de la double enveloppe de l'estomac. A l'aide du raccord rapide, connecter la sortie d'eau de la double enveloppe de l'estomac sur le tuyau permettant le retour de l'eau dans le bain-marie. Vérifier le niveau d'eau du bain-marie. Mettre en route, consigne à 38°C.	
12 – Mise en place des tuyaux de vidange sur les pompes de vidange (J)	Mettre en route la pompe de vidange (1) et placer le tuyau (2). Attention au sens de rotation du rotor et attention aux doigts!	    
13 – Connecter les sorties des tuyaux de vidange et les systèmes de prélèvement (J)	Placer une tablette avec un bec-busen sur le support du digesteur (1). Allumer le bec bunsen. Retirer le bouchon en coton+gaze+alu du tuyau de vidange et connecter le tuyau sur l'entrée de milieu du réacteur suivant. Le tuyau de vidange de l'intestin peut être connecté à un flacon stérile. Placer les systèmes de prélèvement sur les piquages prélèvement des platines du fond des réacteurs.	 

14 – Préparation des apports (J)	Préparer les solutions d'enzymes, d'HCl et de Na_2CO_3. <i>Se référer au mode opératoire "Préparation solutions digesteur"</i> Peser les flacons (stérilement et sans bouchon). Positionner les entrées de chaque pompe dans leurs flacons respectifs, à proximité du bec bunsen. Placer les aiguilles dans les septums, à proximité du bec bunsen (1). Mettre en route les pompes afin de remplir les tuyaux. Arrêter les pompes. Placer le flacon de pepsine + lipase dans un bac de glace. Placer les flacons de bile sur un agitateur chauffant, mettre en route l'agitation et la régulation de température à 50°C. Placer le flacon de pancréatine sur un agitateur simple et mettre en marche l'agitation.	
15 – Etalonnage sondes pH (J)	Etalonner les sondes pH avec les tampons 7 et 4. Rincer la sonde et la tamponner avec du papier essuie-tout. Positionner la sonde sur le tampon 7 et noter la valeur. Rincer la sonde et la tamponner avec du papier essuie-tout. Positionner la sonde sur le tampon 4 et noter la valeur. Rincer et essuyer la sonde. Etalonner la sonde au niveau du logiciel (Etalonnage en 2 points)	
16 – Mise en place des sondes pH sur les réacteurs (j)	Placer une tablette avec un bec bunsen sur le montant du digesteur, à côté de l'estomac. Allumer le bec bunsen. Placer une tablette avec un bécher sur le montant du digesteur, à côté du duodénum. Rincer la sonde pH de l'estomac avec de l'éthanol puis avec de l'eau stérile. Placer la sonde sur la platine du haut de l'estomac.	

	Opérer de la même façon pour la sonde pH du duodénum.	
17 – Mise en place de l'apport d'azote dans le duodénum et dans l'intestin (J)	Connecter la sortie de la bouteille d'azote (1) sur les filtres d'entrée gaz du duodénum et de l'intestin. Ouvrir la bouteille d'azote. Vérifier le débit sur le débitmètre du coffret (300mL/min).	
18 – Remplissage du tuyau substrat (J)	Placer le flacon de substrat sur un agitateur magnétique. A proximité d'un bec bunsen, placer l'entrée du tuyau de la pompe substrat dans le flacon de substrat. Toujours à proximité du bec bunsen, placer la sortie de la pompe sur l'entrée substrat de l'estomac. Faire tourner la pompe afin de remplir le tuyau.	
19 – Lancement de l'essai (J)	Aller dans le menu "suivi d'essai" du logiciel. Sélectionner "consigne" (1). Une fenêtre intitulée "gestion des séquences apparaît" (2). Cliquer avec le clic droit de la souris et sélectionner la fonction "ouvrir" (3). Choisir la séquence que l'on souhaite utiliser. Donner un nom de fichier et une période d'acquisition. Vérifier les paramètres $t_{1/2}$ et β. Vérifier les étapes de la séquence. Enregistrer la séquence. Sortir du menu séquence sans lancer la séquence. SE REFERER AU MODE OPERATOIRE : SEQUENCE DIGESTEUR Vérifier que le logiciel communique bien avec les sondes pH (regarder le paramètre "erreur G" et "erreur D"). Retourner dans le menu séquence. Lancer la séquence	

20 – En cours d'essai

(J)

Vérifier que les mesures pH suivent bien les consignes des séquences.

Si besoin, modifier le paramètre Kp de la régulation de pH . Augmenter ce paramètre si la mesure n'a atteint pas la consigne. Diminuer la valeur de Kp si la mesure dépasse largement la consigne à la moindre action de la pompe HCl ou Na_2CO_3 .

Cliquer sur le rectangle, au centre de la ligne de commande de la régulation (1).

Modifier les valeurs de Kp pour le canal chaud **ET** pour le canal froid (2).

Attention au pH duo en fin de phase duodénale.

Vérifier que le tuyau de vidange gastrique ne se bouche pas.

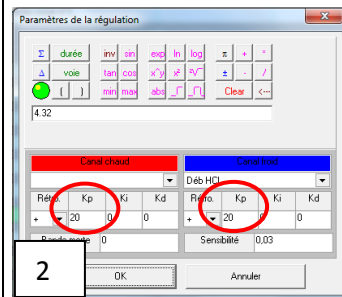
Vérifier que les tuyaux de pompes ou du circuit d'eau de la double enveloppe ne sont pas pincés.

Vérifier que l'azote circule bien dans les compartiments en regardant si du gaz passe dans le filtre de sortie des compartiments duodénal et intestinal.

Penser à changer les flacons de vidange intestinal lorsqu'ils sont remplis **et les peser**.



1



2

21 – En cours d'essai Les prélèvements

(J)

L'utilisateur a la possibilité de réaliser des prélèvements afin de suivre l'évolution du processus de digestion.

Dans tous les compartiments, des prélèvements peuvent être effectués grâce à un orifice situé sur la platine du dessus (1).

Il faut alors penser à arrêter l'agitation.

On utilise des pipettes de 1 mL.

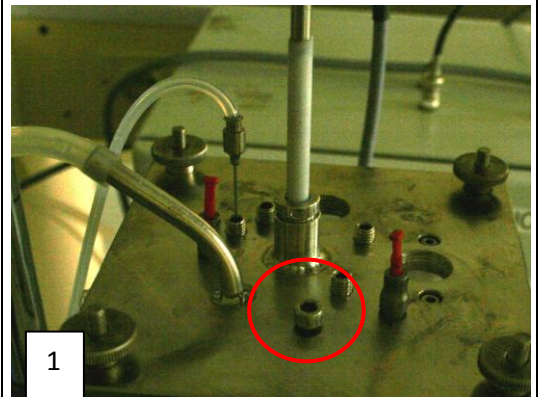
Lorsque le prélèvement doit être fait de façon stérile, il faut placer une tablette avec un bec bunsen sur le support du digesteur.

Pour l'estomac et le duodénum, un système de prélèvement par la platine du fond du réacteur peut être utilisé (2).

A l'aide de la grosse seringue, purger le tuyau de prélèvement en insufflant de l'air par un filtre de pores de $0.22\mu\text{m}$ de diamètre.

Aspirer l'échantillon avec la seringue de 2 mL.

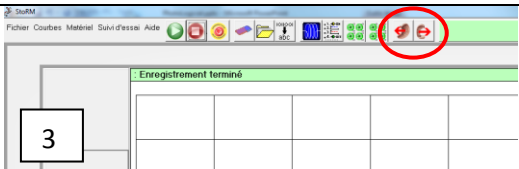
Retirer la seringue contenant l'échantillon.

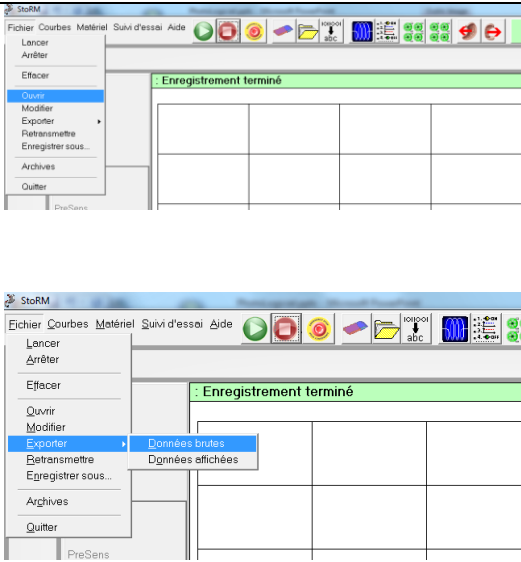


1



2

	Essuyer l'embout avec une lingette stérile et la laisser sur l'embout jusqu'au prochain prélèvement. Purger à nouveau le tuyau de prélèvement. Indiquer au logiciel les prélèvements réalisés en cliquant sur les icônes présentés ci-contre (3).	
22 – Nettoyage (J)	COUPER L'ARRIVER D'AZOTE Arrêter le bain marie et déconnecter les raccords rapides du circuit d'eau de la double-enveloppe. Déconnecter les axes d'agitation des moteurs. Retirer les sondes pH et les nettoyer avec de l'eau puis de l'alcool puis à nouveau de l'eau. Les placer dans la solution de KCl. S'il reste du milieu dans les compartiments, vidanger celui-ci dans un bécher en retirant le tuyau de vidange et peser. On pourra faire également une comparaison avec la valeur "V Restant G, D ou I" donnée par le logiciel. Retirer les compartiments du support. Les démonter et les nettoyer avec du RBS 5%. Attention à ne pas utiliser la partie abrasive de l'éponge pour nettoyer les spots de mesure d'O₂ s'ils sont présents sur les réacteurs. Rincer et laisser sécher. Déconnecter les tuyaux du circuit de la double enveloppe et les vidanger. Retirer les aiguilles des septums et les placer dans un bécher vide. Retirer les entrées des tuyaux des pompes des flacons d'apports et les placer dans un bécher contenant du RBS 5%. Faire tourner les pompes afin de les nettoyer. Laisser tourner environ 15 min. Remplacer le bécher de RBS par un bécher d'eau. Laisser tourner les pompes une quinzaine de minutes puis vidanger les tuyaux. Arrêter les pompes. Peser les flacons d'apports : enzyme, acide et base, substrat. Ces valeurs seront comparées avec les valeurs	

	théoriques données par le logiciel. Rincer les flacons et les placer dans les bacs de récupération de vaisselle salle. Ranger les flacons HCl et Na₂CO₃. Penser à retirer les étiquettes. Nettoyer les tuyaux de vidange et les systèmes de prélèvements avec du RBS que l'on fait passer avec une seringue. Rincer avec de l'eau de la même manière et laisser sécher. ARRETER LE LOGICIEL ETEINDRE LE COFFRET ETEINDRE LE PC	
23 – Récupération des données de l'essai	L'utilisateur peut reprendre l'ensemble des données de l'essai sous un tableur type EXCEL. Pour cela, il faut lancer STORM et "ouvrir" l'essai. Une fois l'essai rechargé, faire une exportation des données brutes. Un nouveau fichier du même nom mais au format .TXT sera créé. Ce fichier pourra être ouvert sous le tableur.	

Manip EcoD-1 / Sept-13 : TNBS-colitis & DSS-colitis; Ecodige

NA/CP/JB/BF.



Study design

100 Balb/C Mice from Charles River 6-7 weeks old

group A : n=5 mice **control buffer**, PBS 0.5 ml to 1 ml/d/mouse (A1-A5)group B : n=5 mice, **Dairy matrix** 0.5 ml to 1 ml/d/mouse (B1-B5)group C : n=5 mice : **Cheese A** 0.5 ml to 1 ml/d/mouse (C1-C5)group D : n=5 mice : **Cheese B** 0.5 ml to 1 ml/d/mouse (D1-D5)

healthy mice

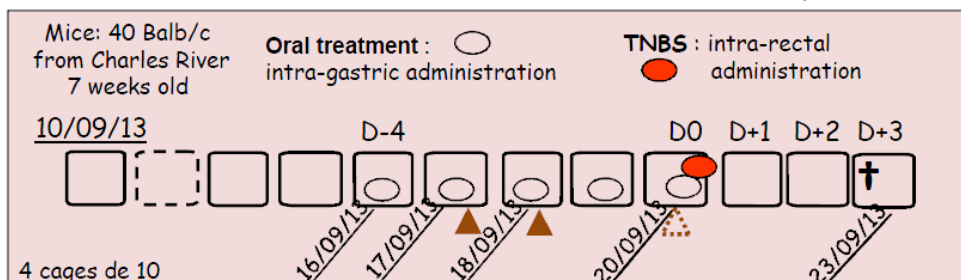
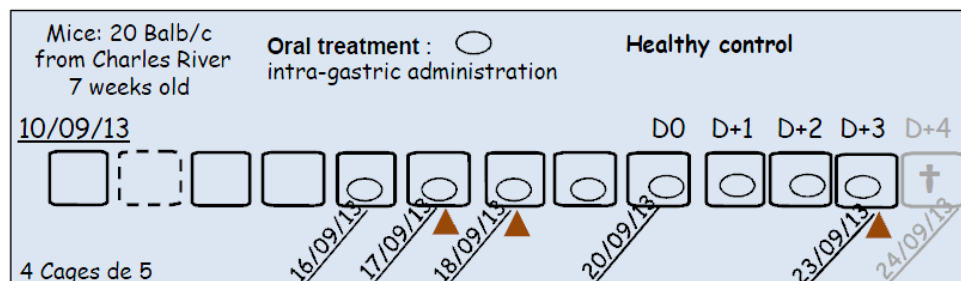
group A : n=10 mice **control buffer**, PBS 0.5 ml to 1 ml/d/mouse (A6-A15)group B : n=10 mice, **Dairy matrix** 0.5 ml to 1 ml/d/mouse (B6-B15)group C : n=10 mice : **Cheese A** 0.5 ml to 1 ml/d/mouse (C6-C15)group D : n=10 mice : **Cheese B** 0.5 ml to 1 ml/d/mouse (D6-D15)+ TNBS
(100-110 mg/kg)group A : n=10 mice **control buffer**, PBS 0.5 ml to 1 ml/d/mouse (A16-A25)group B : n=10 mice, **Dairy matrix** 0.5 ml to 1 ml/d/mouse (B16-B25)group C : n=10 mice : **Cheese A** 0.5 ml to 1 ml/d/mouse (C16-C25)group D : n=10 mice : **Cheese B** 0.5 ml to 1 ml/d/mouse (D16-D25)+ DSS
(100-110 mg/kg)

Manip EcoD-1 / Sept-13 : TNBS-colitis & DSS-colitis; Ecodige

NA/CP/JB/BF.



Study design



Parameters

Body Weight

Spleen weight

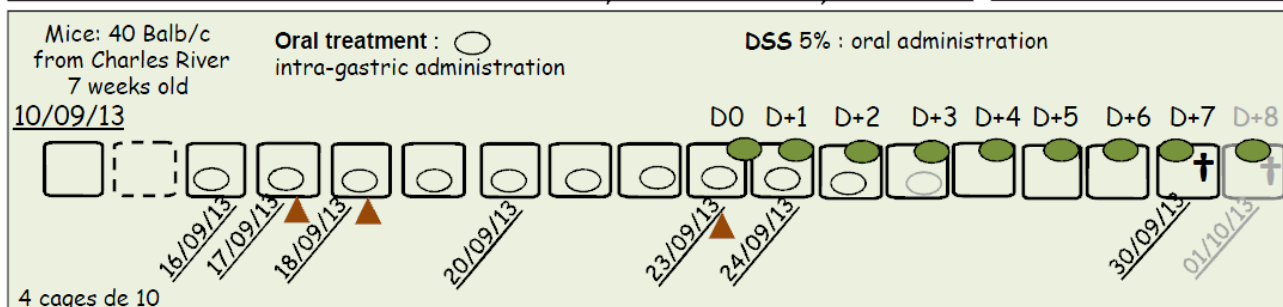
Macroscopic scores

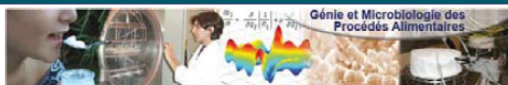
MPO + colon length

Serum SAA and IL-6

Histological scores

Quant. RT-PCR samples



N.Adouard^{*1}, B.Foligné², L.Magne¹, T.Cattenoz¹, D.Picque¹, P.Bonnarme¹

nadege.adouard@grignon.inra.fr

¹INRA-AgroParisTech, UMR 782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires, F-78850 Thiverval-Grignon, France² Institut Pasteur de Lille, Lactic Acid Bacteria & Mucosal Immunity, Center for Infection and Immunity of Lille, 1, Rue du Pr Calmette, BP 245, F-59019 Lille, France

Introduction

- Worldwide, the Food Industry uses a broad range of microorganism while making fermented products. Most of microorganisms are alive when the food is ingested; it therefore appears important to determine how such microorganisms react during the digestive transit as well as to characterize their potential impact on the colon.
- Our work aims at studying the digestive stress response of the smear-ripened cheese microflora, along with its potential effect from an immunomodulatory point of view. Previous experiments involving microorganisms in pure culture submitted to dynamic digestive stress showed that an important part of the intake microorganisms actually do survive the challenge.
- We thereby selected 13 strains with different immunomodulatory profiles, enabling us to make two model-cheeses and applied *in vitro* digestive challenges to the ripened cheeses. We then fed mice with induced colitis with the two different cheeses to assess their potential "pro-" or "anti-inflammatory" effect.

Material and methods

In vivo : induced colitis in mice

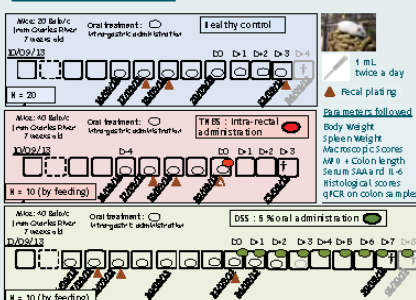
The cheese making was realised at a pilot scale in order to obtain one cheese qualified as « pro-inflammatory » and one cheese qualified as « anti-inflammatory ».

Species used for cheese making :

- Bacteria**
- Lactococcus lactis*
 - Brevibacterium aurantiacum*
 - Corynebacterium casei*
 - Arthobacter arilaitensis*
 - Staphylococcus equorum*
 - Hafnia alvei*
- Yeasts**
- Debaryomyces hansenii*
 - Kluyveromyces lactis*
 - Geotrichum candidum*

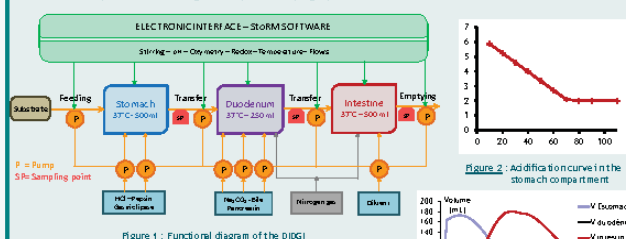


Experimental procedure :



In vitro : Digestive challenge

The Gastro-Intestinal Dynamic Digesteur (DIDGI) [1], allows us to take into account kinetic aspects of the digestive process (Fig.1)



-Acidification curve has been chosen as representative of a dairy product digestion (Fig. 2)

-Transfer curves between compartments (Fig.3) have been established from physiological data, as well as enzyme and bile additions.

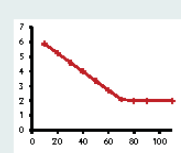


Figure 2 : Acidification curve in the stomach compartment

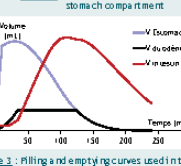


Figure 3 : Filling and emptying curves used in the different compartments of the DIDGI

Results and Discussion

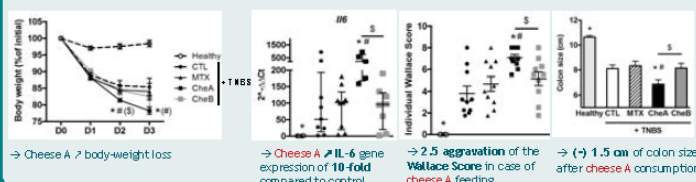
In vivo : induced colitis in mice

Microorganisms survival to digestive tract :

- 8 hours after feeding
- Bacteria** : *H.alvei* (+++), *S.equorum* (++), *C.casei* (+), *B.aurantiacum* (+), *A.arilaitensis* (-)
- Yeast** : *G.candidum* (+++), *K.lactis* (++)
- No persistence of the strains after the 7 day-feeding period and a washing period

Cheese and TNBS-induced colitis :

→ Cheese A (pro-inf) significantly enhanced the colitis → Cheese B (anti-inf) did not protect against colitis



Cheese and control mice :

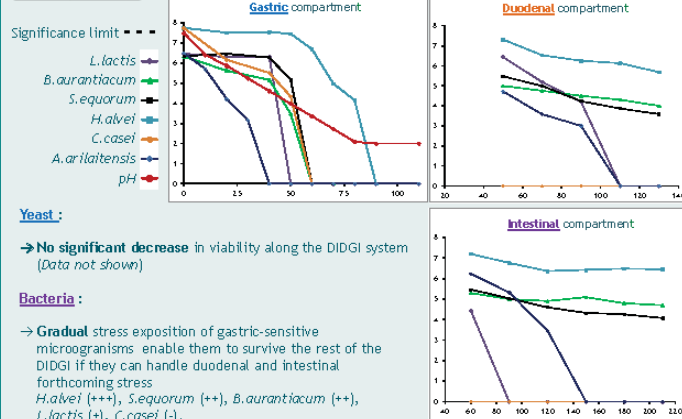
→ No significant change in the chosen parameters

Cheese and DSS-induced colitis :

→ Neither cheese A or B significantly protected nor aggravated the colitis
→ However, slight tendency to strengthen the inflammation

In vitro : Digestive challenge

DIDGI experiments :



Yeast :

→ No significant decrease in viability along the DIDGI system (Data not shown)

Bacteria :

→ Gradual stress exposition of gastric-sensitive microorganisms enable them to survive the rest of the DIDGI if they can handle duodenal and intestinal forthcoming stress
H.alvei (+++), *S.equorum* (++), *B.aurantiacum* (++), *L.lactis* (+), *C.casei* (-).

Conclusions

- Smear-ripened cheese microflora appears to be fairly able to handle the digestive stress since both *in vitro* and *in vivo* experiments showed living microorganisms at the end of the procedure.
- A cheese made with "pro-inflammatory" consortium did not provoke inflammation in healthy mice but aggravate TNBS-induced colitis.
- A cheese made with "anti-inflammatory" consortium did not disrupt homeostasis in healthy mice but did not protect against TNBS or DSS-induced colitis.
- Further investigations on the role of the cheese matrix in both protection against digestive stress and potential immunomodulatory properties are planned.



La flore microbienne fromagère est-elle capable de survivre aux stress digestifs ?



Nadège ADOUARD¹, Pascal BONNARME¹, Daniel PICQUE¹, Marielle BOUIX¹, Benoît FOLIGNE²
¹INRA-AgroParisTech, UMR 782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires, Centre de Biotechnologies Agro-Industrielles, 78850, Thiverval-Grignon, France
²Institut Pasteur de Lille/UMR 804 Center for Immunity and Infection F-59019 Lille
 Contact : nadege.adouard@grignon.inra.fr

INTRODUCTION

L'agroalimentaire utilise une grande diversité de micro-organismes lors de la fabrication des aliments fermentés. La plupart de ces micro-organismes sont vivants lors de l'ingestion des aliments. Il est donc important d'identifier leur devenir lors de la digestion ainsi que leur impact éventuel au niveau intestinal. L'objectif de ce travail est d'étudier la réponse au stress digestif de micro-organismes d'affinage constitutifs du fromage. Nous avons sélectionné 35 souches représentatives de la biodiversité de l'écosystème des fromages à pâte molle [1], assignés à 13 espèces différentes. Nous avons soumis ces micro-organismes à des stress digestifs « statiques » puis « dynamiques » et nous avons établi en parallèle leur potentiel immunomodulateur.



I. SCREENING STATIQUE

Les 35 micro-organismes sélectionnés ont été cultivés dans des bouillons nutritifs correspondants, récoltés en phase stationnaire et mis en contact direct avec un jus gastrique et duodénal synthétiques. Aucune donnée n'étant disponible dans la littérature, ce screening « statique » a permis de classer les micro-organismes sélectionnés selon leur sensibilité à ces stress.

Composition des jus et conditions d'application des stress

- ✓ **Jus gastrique** : pepsine (1000 U.mL⁻¹)
lipase gastrique (60U.mL⁻¹)
pH 3 - 1H
- ✓ **Jus duodénal** : Pancréatine (9 g.L⁻¹)
Bile (30g.L⁻¹)
pH 6,5 - 2H

L'application indépendante du stress gastrique et du stress duodénal a permis d'établir si l'effet d'un des stress était prépondérant lors d'un stress combiné. Ce découplage a aussi permis d'établir la résistance éventuelle de certaines souches à l'un de ces deux stress :

- ✓ Résistance au stress gastrique : *L. lactis*
- ✓ Résistance au stress duodénal : *S. equorum*
B. aurantiacum
C. casei (faible)
- ✓ Résistance à aucun des stress : *A. orlantisensis*
S. thermophilus
L. delbrueckii ssp. *bulgaricus*

Résultats obtenus lors d'un stress combiné -gastrique puis duodénal-

Micro-organismes sensibles [S]	Micro-organismes résistants [R]
Mortalité totale	Survie > 99%
<i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Staphylococcus equorum</i> (1 souche) <i>Brevibacterium aurantiacum</i> <i>Corynebacterium casei</i> <i>Arthrobacter orlantisensis</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i> <i>Debaryomyces hansenii</i> <i>Kluyveromyces fragilis</i> <i>Geotrichum candidum</i> <i>Penicillium camemberti</i> <i>Hafnia alvei</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus equorum</i> (2 souches)

- Exception faite de *S. equorum*, aucune différence intra-espèce n'a été identifiée.
- Les micro-organismes suivants ont été retenus pour le screening dynamique :

<i>Lactococcus lactis</i> [S]
<i>Brevibacterium aurantiacum</i> [S]
<i>Staphylococcus equorum</i> 1 [S] / 1 [R]
<i>Corynebacterium casei</i> [S]
<i>Arthrobacter orlantisensis</i> [S]
<i>Hafnia alvei</i> [R]

II. SCREENING DYNAMIQUE

Le Digesteur Dynamique Gastro-Intestinal (DIGI) [2], permet de prendre en compte l'aspect cinétique des apports et des transferts entre compartiments, lors de la digestion. Son fonctionnement est représenté dans le schéma ci-dessous :

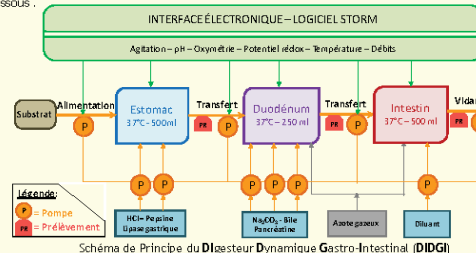
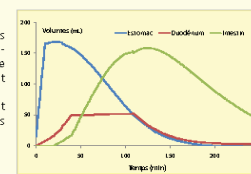


Schéma de Principe du Digesteur Dynamique Gastro-Intestinal (DIGI)

Les cinétiques de transfert entre compartiments auxquelles ont été soumises les micro-organismes sont représentées dans le graphique ci-contre. Le transfert entre compartiments suit la loi d'Elashoff. Les apports d'enzymes et de bile (cinétiques et concentration) ont été établis d'après des données physiologiques.



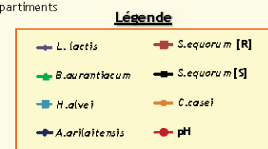
Evolution du volume des compartiments du DIGI au cours du temps

$$f = 1 - 2^{-\left(\frac{t}{t_{1/2}}\right)^p}$$

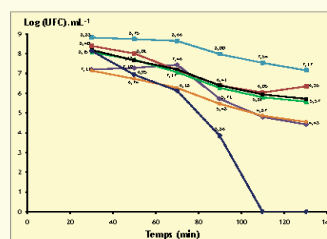
f : fraction vidangée
t : temps
t_{1/2} : temps 1/2 vidange
B : allure de la courbe

Loi d'Elashoff

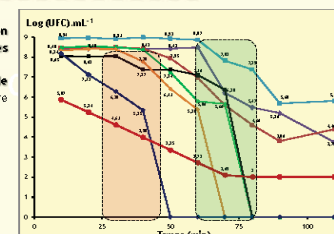
Les courbes suivantes représentent la concentration en micro-organismes en fonction du temps pour chacun des compartiments du DIGI (moyenne de deux tests). Chacune des cinétiques a été corrigée par un facteur de dilution calculé à partir des apports et des transferts entre compartiments



Compartiment Estomac



Compartiment Duodénum



Compartiment Intestin

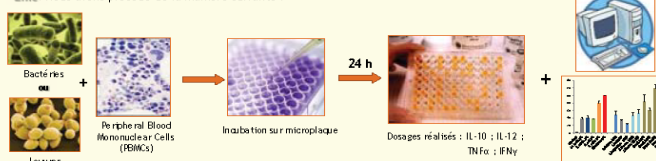
Estomac : Première inflexion à partir de 30-40 min (zone orange), sauf pour *H. alvei* et *L. lactis* - résistantes au stress gastrique statique. Seconde inflexion après 70-80 min (zone verte), sauf pour le *S. equorum* [R]. Ces zones d'inflexions communes semblent indiquer un effet seuil du pH au-delà duquel les micro-organismes ne sont plus en mesure de s'opposer à la baisse du pH extra-cellulaire.

Duodénum : La perte de viabilité s'élève à 1 ou 2 Log(UFC).mL⁻¹ pour les espèces identifiées comme résistantes au stress duodénal en conditions statiques. Les micro-organismes sensibles survivent moins bien (perte de 3 log à la totalité de la population).

Intestin : L'impact de ce compartiment sur la survie des souches les plus résistantes est faible (*H. alvei* et *S. equorum* [R]) et limité sur le reste des micro-organismes. Les espèces les plus sensibles (*L. lactis* et *A. orlantisensis*) sont totalement éliminées à la fin du test.

III. PROFIL IMMUNOMODULATEUR

La caractérisation des micro-organismes du point de vue immunomodulation a été réalisée à l'Institut Pasteur de Lille. Nous avons procédé de la manière suivante :



1. Mise en contact : Micro-organismes sélectionnés ↔ Cellules immuno-compétentes «Peripheral Blood Mononuclear Cells» (PBMCs) de différents donneurs.
2. Dosage de marqueurs de l'inflammation : IL-10; IL-12; IFNγ et TNFα
3. Calcul de ratio à partir des précédents dosages :
- IL-10/IL-12 pour les bactéries
- TNFα/IL-10 pour les eucaryotes
4. Normalisation des résultats grâce au profil de souches références : un *Bifidobacterium longum* [anti-inflammatoire]
un *Lactococcus lactis* [pro-inflammatoire]

Pro-inflammatoire	Neutre	Anti-inflammatoire
<i>L. lactis</i> <i>H. alvei</i> (1 souche) <i>C. casei</i> (1 souche) <i>S. thermophilus</i> (2 souches)	<i>H. alvei</i> (1 souche) <i>S. equorum</i> (1 souche)	<i>B. aurantiacum</i> (3 souches) <i>A. orlantisensis</i> (3 souches) <i>C. casei</i> (1 souche) <i>S. equorum</i> (1 souche) <i>G. candidum</i> (1 souche) <i>D. hansenii</i> (3 souches) <i>K. lactis</i> (3 souches)

Les résultats obtenus montrent une importante souche dépendance du profil immunomodulateur, en particulier chez les bactéries.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les screenings statique et dynamique nous ont permis de caractériser des souches encore non étudiées du point de vue de leur résistance aux stress digestifs. L'utilisation du DIGI a confirmé la nécessité de tenir compte de l'aspect cinétique de la digestion lors de test *in vitro*. En effet, le transfert entre compartiments permet le passage de micro-organismes peu stressés dans les compartiments suivants dans des concentrations non négligeables d'un point de vue immunomodulateur. La caractérisation des profils immunomodulateurs des micro-organismes nous a permis de constituer des écosystèmes réduits, aux profils *a priori* différents, qui seront inoculés en mini-fromages. Ces travaux seront une première étape dans l'étude de l'influence de la préadaptation en écosystème sur, d'une part la survie, et d'autre part, la réponse immunomodulatrice. Des tests sur souris à la flore basale standardisée apporteront des informations sur les capacités *in vivo* de ces micro-organismes.

Références [1] Iringer, F. and J. Maurier (2009). "Microbial Interactions in cheese: Implications for cheese quality and safety." Current Opinion in Biotechnology 20(2): 142-148.
 [2] Guillen H., Perret B., Picque D., Menard O., Cottenoz T. (2010). Logiciel StoRM - Stomach and duodenum Regulation and Monitoring, ICDCN.FR.001.230009.000.R.P.2010.000.31235

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jff

Designing specific cheese-ripening ecosystems to shape the immune effects of dairy products?



Coline Plé ^{a,1}, Nadège Adouard ^{b,1}, Jérôme Breton ^a, Joëlle Dewulf ^a,
Bruno Pot ^a, Pascal Bonnarme ^b, Benoît Foligné ^{a,*}

^a Institut Pasteur de Lille, Lactic Acid Bacteria & Mucosal Immunity, Center for Infection and Immunity of Lille, U1019, UMR 8204, Université de Lille, Rue du Pr Calmette, BP 245, Lille F-59019, France

^b INRA-AgroParisTech UMR 782 Microbiology and Food Process Engineering (GMPA), Avenue Lucien Brétignères, Thiverval-Grignon, F-78850, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 September 2014

Received in revised form 25

November 2014

Accepted 26 November 2014

Available online

Keywords:

Smear-cheese microflora

PBMC

Immunomodulation

Colitis

Mouse model

ABSTRACT

Although large numbers of viable microorganisms are ingested in ripened cheese, little is known about the microbial ecosystems' influence on the host's immune responses. We designed experimental smear-ripened cheeses with bacteria and yeasts that have opposite immune effects and evaluated their impact in the dextran sulphate sodium (DSS) and trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) colitis mouse models. Mice were fed with a control diet, a milk matrix or with lab-designed, 28-day-ripened prototype soft cheeses A and B (CheA and CheB) from cow milk that respectively hosted consortia of immuno-enhancing and immuno-modulatory microbial strains. Inflammatory markers and transcriptional signatures were evaluated in healthy mice colitic mice. In the DSS colitis model, there were no differences between CheA and CheB in terms of the inflammatory read-outs. In contrast, CheA (but not CheB) exacerbated weight loss and colon lesions in the TNBS model suggesting that designer cheeses may provide opportunities for diet management.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The role of dietary habits as an environmental risk factor (Gentschew & Ferguson, 2012; Ng et al., 2013) or a factor able to prolong remission in inflammatory bowel disease (IBD) (Rajendran & Kumar, 2010) has not received a great deal of re-

search attention. Diet may influence gut inflammation through several biologically plausible mechanisms, including antigenic responses to food and alteration of the host microbiota (Clarke & Mullin, 2008; Viladomiu, Hontecillas, Yuan, Lu, & Bassaganya-Riera, 2013). However, the association between diet and IBD has not been clearly demonstrated – mostly because the etiology of both Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis

Funding

The work was funded by the Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière (CNIEL) S2242 through by the Scientific Committee of Syndifrais/Cniel call for proposals, and is part of the EcoDige project (2012–2015 grant).

* Corresponding author. Institut Pasteur de Lille, 1, Rue du Pr Calmette, BP 245, Lille F-59019, France. Tel.: +33 320 871 191; fax: +33 320 871 192.

E-mail address: benoit.foligne@ibl.cnrs.fr (B. Foligné).

¹ Shared first authorship.

Abbreviations: CD, Crohn's disease; DSS, dextran sulphate sodium; IBD, inflammatory bowel disease; MPO, myeloperoxidase; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; SAA, serum amyloid A; TNBS, trinitrobenzene sulphonic acid; TNF- α , tumor necrosis factor alpha; UC, ulcerative colitis

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2014.11.021>

1756-4646/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

(UC) are not fully understood. The impacts of genetic factors, microbiome diversity and environmental factors have been well documented. Some risk factors and modulators, however, may vary in their influence; for example, smoking cessation improves CD but worsens UC (Birrenbach & Bocker, 2004; Cosnes, 2004). Identification of the food types or components responsible for beneficial effects in IBD is tricky, since a range of doses and frequencies of macronutrients and micronutrients (including trace elements and pollutants) have to be considered. Although discriminating between causes and effects is challenging, there is a clear association between the incidence of IBD and loss of diversity within gut microbiota. This association fits with the hygiene hypothesis (Bach, 2002; Khosravi et al., 2014), in which the use of antibiotics and the increased consumption of refined food in our diet depletes the amount and activity of raw and fermented foods (Petrof, Claud, Gloor, & Allen-Vercoe, 2013). Thus, both nutritional food supplements and/or diets containing “healthy” food microbes are recommended.

Although it is widely acknowledged that the intake of the so-called probiotic microorganisms is able to influence the host's immune responses (Foligné, Daniel, & Pot, 2013; Marteau et al., 2004; van Baarlen, Wells, & Kleerebezem, 2013) epidemiological data on IBD and fermented foods (especially cheeses) are scarce. Some case-control studies have indicated that a high cheese intake is associated with CD (Maconi et al., 2010), whereas others have shown that patients with IBD eat cheese less frequently (Zvirbliene, Kiudelis, Zalinkevicius, & Kupcinskas, 2006). Meta-analyses of the impact of dairy products and cheese on diseases are inconsistent, since no particular cheese types or cheese-derived core microbial ecosystems have been clarified (Aune et al., 2012; Labonte, Couture, Richard, Desroches, & Lamarche, 2013). Although cheese-enriched diet was found to enhance anti-inflammatory and immune regulatory responses in normal mice and in a dextran sulfate sodium (DSS) colitis mouse model (Hosoya, Ogawa, Sakai, & Kadooka, 2012), the beneficial outcomes were not attributed to specific microorganisms (whether as live forms or inactivated). In addition to potentially bioactive peptides (Beermann & Hartung, 2013; Korhonen, 2009), fatty acids and amines in milk, dominant cheese microbiota should also be considered (Stanton, Ross, Fitzgerald, & Van Sinderen, 2005). Indeed, foodborne bacteria and fungi from cheese are detectable in the human distal colon, where they have been shown to be metabolically active and capable of altering the resident microbiota (David et al., 2014). Moreover, many microbial-derived antigens, secreted compounds, surface molecules and cell-wall components (such as peptidoglycan, exopolysaccharides, teichoic acids, and mannans) have immunomodulatory properties (Lebeer, Vanderleyden, & De Keersmaecker, 2010). Whereas the type of immune-related response clearly depends on the intrinsic characteristics of each microbe from defined genera and species (e.g. Gram-positive or Gram-negative bacteria, yeasts and fungi), precise immune tuning will be strain-specific (as demonstrated *in vitro* for probiotic strains of lactic acid bacteria (LAB) such as lactobacilli (Foligne et al., 2007a, 2007b; Nova et al., 2007) and bifidobacteria (Hoarau et al., 2008; López, Gueimonde, Margolles, & Suárez, 2010; Riedel et al., 2006) and yeasts (Foligné, Dewulf, Vandekerckove, Pignède, & Pot, 2010; Maccaferri, Klinder, Brigidi, Cavina, & Costabile, 2012; Romanin et al., 2010). Previous re-

search has demonstrated the major role of bacterially induced IL-10 *in vitro* and the associated potential for relieving experimental colitis *in vivo* (Foligné et al., 2010; Foligne et al., 2007a, 2007b; Hoarau et al., 2008; López et al., 2010; Maccaferri et al., 2012; Peran et al., 2005; Riedel et al., 2006; Romanin et al., 2010). However, attempts to characterize the immune patterns induced by strains from cheese-ripening ecosystems are rare (Rahman et al., 2013) and have been restricted to non-starter LAB.

We have previously studied the diverse immunomodulatory properties of various microbial strains used in the preparation of dairy products (Adouard, unpublished data). By considering neutral, immuno-enhancing and immuno-regulatory bacteria and yeasts, we defined distinct starter mixtures with opposite properties and used them to produce experimental cheeses likely to have opposite immune effects. Given that the health effects of probiotics are strain-specific, we postulated that multiple-strain preparations would be more effective than single-strain preparations (Timmerman, Koning, Mulder, Rombouts, & Beynen, 2004). In the context of gut inflammation, multiple-strain preparations have never been assessed in pre-clinical or clinical trials. There is increasing evidence to suggest that murine colitis may be prevented by administering several mixtures (Drouault-Holowacz et al., 2006; Gionchetti et al., 2012; Hart et al., 2004; Rachmilewitz et al., 2004; Roselli et al., 2009), although the efficacy varies with the composition of the mixture (Roselli et al., 2009). Similarly, the immune and health properties of multiple-strain and multiple-species probiotic mixes in a cheese ecosystem cannot be deduced from their respective components (Chapman, Gibson, & Rowland, 2011; Timmerman et al., 2007). Thus, we decided to screen various mixtures for their immuno-regulatory potential, with the objective of selecting optimal strains as tools for further cheese-making experiments (i.e. custom ripened dairy products with either neutral, anti- or pro-inflammatory-like dominant ecosystems). Indeed, prototype cheeses may be useful in evaluating the effects of immune intervention in pre-clinical models of immune-dysregulated diseases (such as colitis).

This type of tool would be of great interest for better dietary management in immune-related disorders and could open up new perspectives in cheese-making. For example, a custom-designed cheese could form part of an appropriate diet in a specific at-risk population or patient population.

The objective of the present study was thus to evaluate the potential impact of fermented dairy products (based on the immune determinants of their microbial components), rather than to design a “probiotic cheese” *per se*.

2. Material and methods

2.1. Microorganisms, growth conditions and mixtures

In the present study, 14 strains (10 bacteria, 3 yeasts and 1 fungus isolated from a dairy environment) were considered. Furthermore, five reference strains (*Bifidobacterium longum* Bb536, *Escherichia coli* TG1, *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Lactobacillus salivarius* Ls33 and *Lactococcus lactis* MG1363, Table S1) were used for immune cell stimulation, as previously described (Foligné et al., 2010). All strains used in this study were

Table 1 – Composition of the various mixtures of microbial strains used in the present study. The most IL-10-inducer strains (the so-called anti-inflammatory) are specified in bold while those which are more associated with a pro-inflammatory response are indicated as underlined.

Strains	Mix 1	Mix 2	Mix 3	Mix 4	Mix 5	Mix6
<i>Lc. lactis</i>	S3	S3	S3	S3	S3	S3
<i>B. aurantiacum</i>	ATCC 9174	ATCC 9174	ATCC 9174	ATCC 9174	ATCC 9174	ATCC 9174
<i>A. arilaitensis</i>	Re 117 ^T	Re 117 ^T	Re 117 ^T	Re 117 ^T	Re 117 ^T	Re 117 ^T
<i>H. alvei</i>	GB01	<u>Type 2 n°920</u>	GB01	–	GB01	GB01
<i>S. equorum</i>	1265/GM16	<u>Mu206</u>	1265/GM16	1265/GM16	1265/GM16	1265/GM16
<i>C. casei</i>	DPC S298^T	<u>1-3b</u>	DPC S298^T	DPC S298^T	DPC S298^T	DPC S298^T
<i>D. hansenii</i>	CLIB 623	CLIB 623	CLIB 623	CLIB 623	CLIB 623	CLIB 623
<i>K. lactis</i>	CLIB 683	CLIB 683	CLIB 683	CLIB 683	CLIB 683	CLIB 683
<i>G. candidum</i>	UCMA 103	<u>ATCC 204307</u>	–	UCMA 103	UCMA 103	<u>ATCC 204307</u>
<i>P. camemberti</i>	–	–	–	–	<u>FM 13</u>	–

identified by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (Microflex Technology, Bruker Daltonics, Fremont, CA, USA), as previously described (Blondiaux, Gaillot, & Courcol, 2010). All growth media were purchased from Difco (Pessac, France). With the exception of *Hafnia alvei* (grown in Luria Bertani medium), bacterial cheese isolates were grown in 100 mL of brain heart infusion broth in 500 mL Erlenmeyer flasks at 25 °C and were placed on a shaking table (200 rpm). *Lactococcus lactis* was cultivated in M17 medium supplemented with 0.5% glucose in 100 mL Schott bottles at 30 °C. *Lactobacilli* were grown at 37 °C with limited aeration in de Man, Rogosa, Sharpe (MRS) broth in 100 mL Schott flasks while *E. coli* was grown at 37 °C in LB medium and *B. longum* was grown anaerobically in MRS broth supplemented with 0.05% L-cysteine-hydrochloride (Sigma, St Quentin Fallavier, France). Yeasts and fungi were grown in 100 mL of potato dextrose broth in 500 mL Erlenmeyer flask, at 25 °C and shaken at 200 rpm. All strains were grown until the late stationary phase (as measured in preliminary growth experiments; data not shown). The reference strain preparations were prepared as follows: stationary-phase microbes were washed twice in PBS and resuspended in PBS containing 20% glycerol to adjust the cell density to McFarland 3 using a portable photometer (Densimat, bioMérieux, Craponne, France) (Araujo, Rodrigues, & Pina-Vaz, 2004).

In order to mimic complex multiple-strain cheese ecosystems as closely as possible, six distinct mixtures of ten or so bacteria and yeasts were prepared (Table 1). Each of the mixtures had a bacteria/yeast ratio of 1. Hence, the component volumes (in a total volume of 200 µL) were as follows: *Lactococcus lactis* 25 µL, *Brevibacterium aurantiacum* 15 µL, *Arthrobacter arilaitensis* 15 µL, *Hafnia alvei* 15 µL, *Staphylococcus equorum* 15 µL, *Corynebacterium casei* 15 µL, *Debaryomyces hansenii* 33 µL, *Kluyveromyces lactis* 33 µL, *Geotrichum candidum* 33 µL.

2.2. Chemicals

Chemicals and reagents were purchased from Sigma-Aldrich Chemical, St Quentin Fallavier, France, unless otherwise stated.

2.3. Peripheral mononuclear blood cell (PBMC) assay

Peripheral mononuclear blood cells (2×10^6 /mL) isolated from three healthy donors were seeded in RPMI 1640 medium (Life

Technologies, Paisley, United Kingdom) in 24-well tissue culture plates (Corning, New York, NY, USA), as previously described (Foligne et al., 2007a, 2007b). Ten microliters of thawed suspensions of the mixtures or individual reference strains to be tested was added. After 24 h of stimulation, culture supernatants were collected and assayed for cytokine levels using ELISAs for human IL-10, IFN γ and IL-12p70 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and human IL-6 and TNF α (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), according to the manufacturer's recommendations. Data were first generated in pg·L⁻¹ for each donor and then expressed as the mean for all three donors as a percentage of the value measured with a reference strain (i.e. *B. longum* Bb536 for IL-10 and *Lc. lactis* MG1363 for IL-12, TNF α and IFN γ). This normalization against internal standard strains has been validated as an accurate and reproducible way of comparing large numbers of strains (Foligne et al., 2007a, 2007b).

2.4. Experimental/prototype cheeses and the feeding procedure

Pilot-scale Livarot-type cheese was produced (via coagulation, cutting, draining, and molding of the curd) under aseptic conditions in a 14 L tank. The pasteurized milk used (12 L) was standardized at a fat concentration of 29 g/L fat by mixing semi-skimmed and full-fat milk (Alsace Lait, Hoerd, France). Ten milliliters of a filter-sterilized 100 g·L⁻¹ CaCl₂ solution was added to the milk and the mix was pre-heated at 34 °C prior to adding *Lc. Lactis* to obtain a final concentration of 10⁶ cfu/mL. After the pH of the milk had reached 6.3, a mix of the appropriate selected ripening bacteria and yeast strains was added at concentrations of each microorganism at 10⁶ and 10⁴ cfu/mL, respectively, for both cheese A (CheA) and cheese B (CheB). Filter-sterilized rennet (Naturen, Chr. Hansen, Arpajon, France) containing 520 mg/L of active chymosin was then added (0.3 mL/L of milk). The coagulation time was 20 min, and the curd was cut after 30 min of hardening. The curd was then stirred for 5 min at a rate of 10 stir·min⁻¹. After the curd had stood for 15 min, 6.5 L of whey was removed. Two cheeses were shaped in circular polyurethane molds (200 × 150 × 40 mm) and weighed approximately 900 g each. The molds were then stored at 20 °C and inverted four times (30 min, 2.5 h, 6 h, and 22 h after the molding step). After 24 h, the cheeses were removed from the mold. After another 2 hours, the cheeses were cut into smaller pieces (diameter: 50 mm; thickness: 15 mm; weight:

20 g). These were placed in a sterile environment at 14 °C with a relative humidity of 97% for a 28-day ripening period. In order to compare the cheeses with an analogous matrix (MTX), solidified milk was prepared daily and treated with the filter-sterilized rennet and the CaCl_2 .

For both the DSS and trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) colitis experiments, groups of 10 mice were given either 1 mL of phosphate buffer (the control group), 1 g of the dairy matrix (the MTX group) or 1 g of the corresponding cheeses (the CheA and CheB groups) via the intragastric route. Treatments were given daily (in the late afternoon) for 5 and 10 consecutive days for the TNBS and DSS experiments, respectively.

2.5. Experimental colitis

2.5.1. Animal care and ethical aspects

Ninety female BALB/c mice (aged 7 weeks on arrival) were obtained from Charles River (Saint-Germain-sur-l'Arbresle, France). The animals were randomly divided into groups of five or ten and housed in a controlled environment (with a temperature of 22 °C, a 12 h/12 h light/dark cycle and *ad libitum* access to food and water). All animal experiments were performed according to the guidelines of the Institut Pasteur de Lille Animal Care and Use Committee and in compliance with the Amsterdam Protocol on Animal Protection and Welfare and the Directive 86/609/EEC on the Protection of Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (updated in the Council of Europe's Appendix A). The animal work was also compliant with current French legislation (the French Act 87-848, dated 19-10-1987) and the European Communities Amendment of Cruelty to Animals Act 1976. The study's objectives and procedures were approved by the Nord-Pas-de-Calais region's Ethics and Welfare Committee for Animal Experiments (Lille, France; authorization numbers: 19/2009R and 21/2009R).

2.5.2. DSS-induced colitis and the assessment of inflammation

Acute colitis was induced in BALB/c mice on day 7 by the administration of DSS (molecular weight 36,000–50,000 Da, MP Biomedicals, Illkirch, France) dissolved at a concentration of 5% v/v in the animals' drinking water for 7 consecutive days (Foligne, Nutten, et al., 2007b). Groups of 10 mice were used, and a healthy control group (i.e. not exposed to DSS) was given tap water. Animals were weighed daily. After the mice had been sacrificed, colon lengths and weights were scored before tissue processing for microscopic analysis. Briefly, cross-sectional rings of the mid-colon were fixed in 4% formaldehyde, dehydrated and embedded in paraffin. Sections (thickness: 5 µm) were stained with May–Grünwald–Giemsa reagent and scored as described by Hartmann et al. (2000).

2.5.3. TNBS-induced colitis and inflammation scoring

Acute colitis was triggered on day 5 by the intra-rectal administration of 50 µL to reach 100 mg/kg bodyweight TNBS (Sigma-Aldrich Chemical) in 0.9% NaCl/ethanol (50/50 v/v) (Drouault-Holowacz et al., 2006). The animals were monitored daily for bodyweight loss. Three days after the induction of colitis, mice were sacrificed and blood samples were col-

lected immediately. The serum was separated and frozen (–20 °C). After dissection, two independent observers blindly scored the macroscopic inflammation of the colon on the Wallace scale (Wallace, MacNaughton, Morris, & Beck, 1989). Two-centimeter-long fragments of the distal colon were collected and frozen at –80 °C. Samples for histologic analysis were processed for paraffin-embedded in 5-µm sections and stained with May–Grünwald–Giemsa reagent, as described earlier. Following examination under the microscope, tissue lesions were scored according to the Ameho criteria (Ameho et al., 1997). Lastly, the degree of polymorphonuclear neutrophil infiltration in the distal colon was assessed by quantifying myeloperoxidase (MPO) activity, as described previously (Bradley, Priebat, Christensen, & Rothstein, 1982).

2.5.4. Cytokine and serum amyloid protein A (SAA) assays

Murine IL-6 and SAA levels were measured using commercial ELISA kits from BD Pharmingen (San Diego, CA, USA) and Biosource International (Camarillo, CA, USA), respectively, with a lower limit of detection of 15 pg/mL for IL-6 and 30 ng/mL for SAA.

2.5.5. Real-time quantitative PCR and gene expression analysis

Murine intestinal tissue (0.5 cm lengths of the colon) was processed with RNA stabilization solution (RNA-later, Ambion, Life Technologies) and stored at –80 °C. After homogenization of samples using the FastPrep instrument (MP Biomedicals, Illkirch-Graffenstaden, France), total RNA was isolated using RNA spin columns (Macherey-Nagel, Hoerdt, France). Reverse transcription and real-time PCR were performed with reaction kits (the High-Capacity cDNA RT Kit) and reagents (Universal PCR Master Mix) from Applied Biosystems (Courtaboeuf, France), according to the manufacturer's instructions and published procedures. The PCR reactions were performed with a MX3005P Stratagene machine (Agilent Technologies, Massy, France). For the *Tnfa*, *Il1-b*, *Nos2*, *Cox-2*, *Gpx2*, and *IL6* target genes, a custom gene expression assay (TaqMan, Applied Biosystems) was used with commercially designed and validated primers (Table S2). The housekeeping gene beta-actin was run as an internal control. The recorded data were analyzed using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ calculating method and expressed as a fold-increase over the control group's values.

2.6. Statistical analysis

Results are expressed as the mean ± standard error of the mean. Statistical analysis was performed with a two-tailed Student's t-test or a non-parametric one-way analysis of variance (the Mann–Whitney U-test) when appropriate. The threshold for statistical significant was set to $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Immunomodulatory profiles of microorganism ecosystems

The immunomodulatory effects of the fourteen strain used in the present work had been previously investigated in a larger

study of the diversity of cheese-ripening microorganisms as pure cultures (Adouard, unpublished data). Thus, the release of cytokines by human PBMCs from healthy donors allowed us to determine whether these strains exhibit an anti-inflammatory (*i.e.* high IL-10 inducers and low release of IFN γ and IL-12) or pro-inflammatory (*i.e.* low IL-10 inducers and higher inducers of IFN γ and IL-12) based on *in vitro* profile (relative to the reference strains). In this context, some strains appear to induce responses with intermediary levels of cytokines, then characterized to be more or less neutral, as shown in Table 1. Based on the strain ranking, six different mixtures of strains were reconstituted in order to mimic the bacterial and yeast diversity encountered in prototype ripened-cheese ecosystems (Mounier et al., 2005). We selected no more than 10 microorganisms per mixture and maintained the 1:1 ratio of bacteria to yeast. Using a core set of common strains used in cheese-ripening (including *Lc. lactis*, *B. aurantiacum*, *A. arilaitensis*, *D. hansenii* and *K. lactis*), Mix 1 was completed with four anti-inflammatory strains of *H. alvei*, *S. equorum*, *C. casei* and *G. candidum*. In theory, Mix 1 was the most anti-inflammatory blend. In contrast, Mix 2 was supplemented with four strains showing a pro-inflammatory profile, making it (in theory) the least anti-inflammatory mixture. To estimate the role/importance of an individual strain, four other mixtures were designed by removing, adding or substituting a single species. When compared with Mix 1, Mix 3 lacked an anti-inflammatory strain of *Geotrichum* spp, whereas a pro-inflammatory *G. candidum* was added to the Mix 6. Lastly, Mix 4 lacked an anti-inflammatory strain of *Hafnia* and Mix 5 comprised a strain of *Penicillium camemberti* (Table 2).

The six mixtures' ability to induce PBMCs to release cytokines into the supernatant was compared with the most strongly inducing reference strain, *i.e.* *B. longum* Bb536 for IL-6 and IL-10 and *Lc. lactis* MG1363 for the pro-inflammatory mediators IL-12, TNF α and IFN γ . All mixes were weak inducers of IL-12 and IFN γ and moderate inducers of TNF α ; this is the profile typically observed for mixtures of eukaryotic organisms (Fig. 1A–D). Although just half the biomass was composed of yeasts, the low observed stimulatory ability suggests that yeasts were preponderant in the overall immune response. It may thus be of value to add eukaryotic strains to bacterial mixes that induce pro-inflammatory mediators (IL12, TNF α and IFN γ). In contrast, the presence of yeasts did not influence the bacteria's propensity to induce substantial amounts of IL-6 and IL-10.

The six distinct mixtures stimulated similar amounts of IL-6, IL-12, TNF α and IFN γ , suggesting that the PBMCs sensed the various consortia of microorganisms in much the same way (Fig. 1A–D). However, the mixtures differed significantly in terms of secretion of IL-10 (Fig. 1E). It is noteworthy that Mix 1 induced anti-inflammatory factors to the same extent as the *B. longum* reference strain, whereas (as expected) Mix 2 was significantly less able to induce IL-10 ($p < 0.05$). Compared with Mix 1, the absence of the anti-inflammatory strains *Geotrichum candidum* UCMA 103 or *Hafnia alvei* GB01 (in Mix 3 and Mix 4, respectively) did not modify the net anti-inflammatory balance. In contrast, replacing *G. candidum* UCMA 103 by the neutral strain *G. candidum* ATCC 204307 (in Mix 6) was enough to reverse the mixture's anti-inflammatory characteristics by nearly 50% ($p < 0.05$). Hence, Mix 6 had a low IL-10-stimulating capacity

Table 2 – Final microbial counts reached in the two experimental cheeses.

Microorganisms	Microbial concentration at 28 days of ripening (log CFU·g ⁻¹)	
	Cheese A (Mix2)	Cheese B (Mix1)
Bacteria		
<i>Lc. Lactis</i>		
S3	7.52 ± 0.12	6.25 ± 0.44
<i>B. aurantiacum</i>		
ATCC9174	6.55 ± 0.12	6.07 ± 0.61
<i>C. casei</i>		
1-3b	9.00 ± 0.50	
DPC S298T		8.37 ± 0.32
<i>H. alvei</i>		
GB01		6.90 ± 0.25
Type 2 n°920	7.09 ± 0.18	
<i>A. arilaitensis</i>		
Re117 ^T	6.17 ± 0.18	5.55 ± 0.15
<i>S. equorum</i>		
1265		6.32 ± 0.12
Mu206	6.80 ± 0.17	
Yeasts		
<i>D. hansenii</i>		
CLIB 623	6.41 ± 0.25	6.85 ± 0.29
<i>G. candidum</i>		
UCMA 103		7.81 ± 0.23
ATCC 204307	6.80 ± 0.26	
<i>K. lactis</i>		
CLIB 683	6.90 ± 0.18	7.08 ± 0.15

(close to that of the *Lc. lactis* and *Lb. acidophilus* reference strains). Lastly, addition of the fungus *Penicillium camemberti* (Mix 5) to the anti-inflammatory consortium was also associated with a 50% reduction ($p < 0.05$) in the *in vitro* anti-inflammatory potential.

3.2. The impact of two distinct, designed, ripened cheeses on healthy mice

In view of the different *in vitro* immune potentials of Mix 1 and Mix 2, we decided to inoculate milk with these cocktails in order to produce cheese-like dairy products. The two "tailored" prototype cheeses were prepared simultaneously. After 4 weeks of ripening, the two cheeses had similar final counts for all microorganisms (Table 2).

CheA and CheB (based on fermentation with a poorly anti-inflammatory Mix 2 and the anti-inflammatory Mix 1) were evaluated (along with MTX) in healthy mice. Feeding healthy mice for 8 days with the different diets did not induce any significant changes in body weight or in colonic transcription levels of the tested genes (*i.e.* *Tnf*, *Il1b*, *Il6*, *Il10*, *Ifng*, *Zo1*, *Nos2*, *Ptgs2* and *Hmox1*, with fold-increases or decrease of no more than 1.5 vs. controls). Only a small (twofold) increase in expression of *Pparg* was measured in the CheB group (data not shown). Blood levels of SAA and IL-6 were undetectable, suggesting that all treatments with dairy products were safe and well-tolerated under basal, non-inflamed conditions.

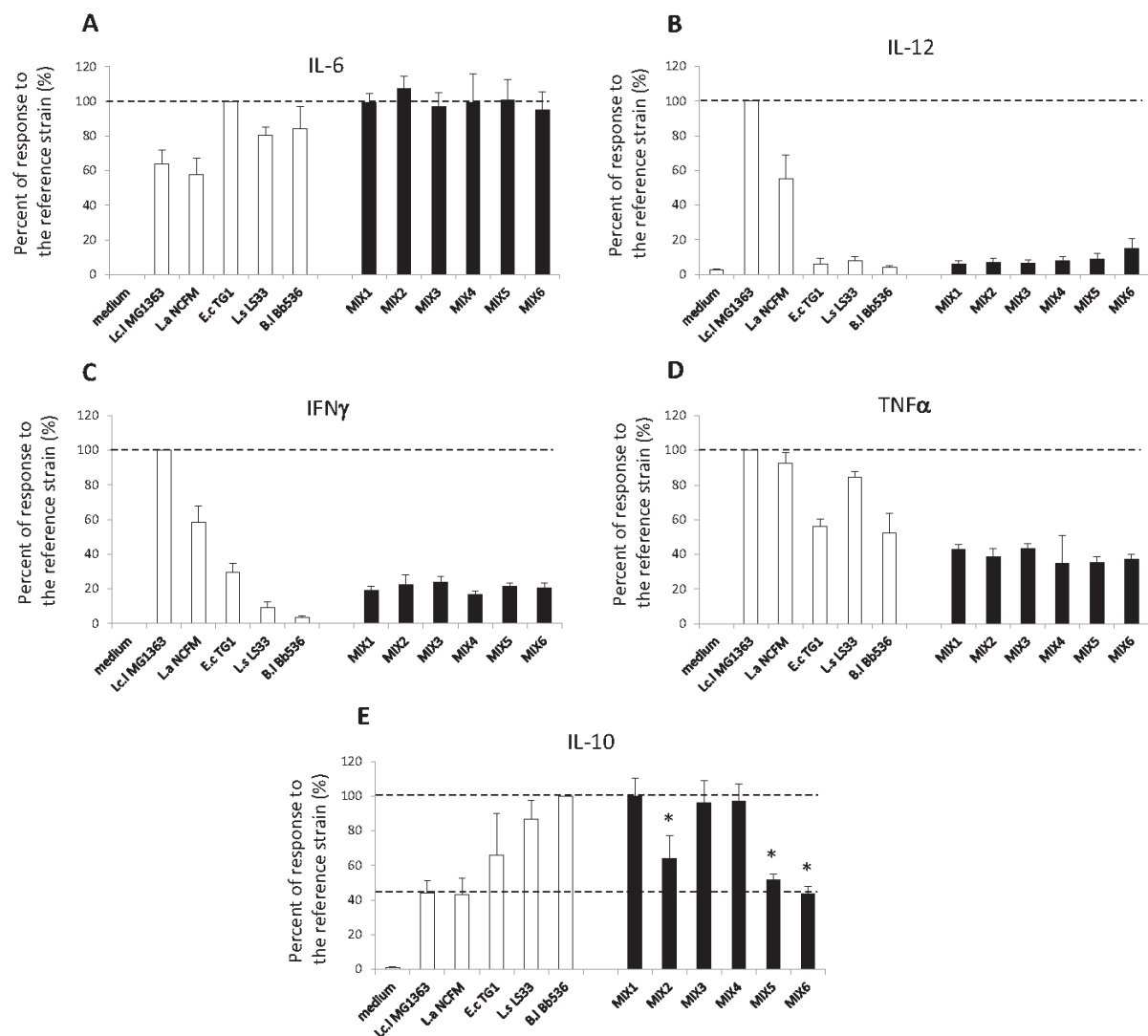


Fig. 1 – Production of various cytokines in the supernatants of cultured human PBMCs (three donors) after 24 h of stimulation with an equivalent mass of reference strains (white bars) or six distinct, reconstituted mixtures of ripened cheese microorganisms. (A) IL-6, (B) IL-12, (C) IFN γ , (D) TNF α and (E) IL-10. Data are expressed as the mean $\pm$ SEM response as a percentage of a high-inducer reference strains (*B. longum* for IL-10 and *Lc. Lactis* for the other mediators).

3.3. The impact of two distinct, designed, ripened cheeses in two murine models of experimental colitis

As expected, 7 days of DSS administration induced severe colitis in mice, with an average bodyweight loss of 15%, significant colon shortening, and elevated macroscopic and histological scores (Fig. 2A–C and data not shown), relative to healthy control mice. Although MTX was associated with a slightly lower weight loss, the MTX, CheA and CheB diets were not associated with any significant protective effects in terms of the inflammatory parameters investigated (data not shown). CheA and CheB were associated with non-significant trends toward the intensification of certain factors (such as macroscopic injury;

Fig. 2B–D). There were no significant differences between CheA and CheB.

In the TNBS colitis model, the symptoms in the control, MTX and CheB groups were quite similar, with body weight loss of up to 15% and similar macroscopic and histological scores (Fig. 3A–C). Transcriptional analysis of the inflammatory marker genes *Cox2*, *Nos2*, *Il6*, *Hmox1*, *Tnf* and *Il1b*, and the measurement of MPO levels and blood SAA levels showed that the degree of induction was similar for all three conditions (Fig. 3D–F). These findings suggest that CheB (the cheese containing the most anti-inflammatory bacterial and yeast strains) had no specific effect on the symptoms of colitis. In contrast, mice fed for 5 consecutive days with CheA (the cheese

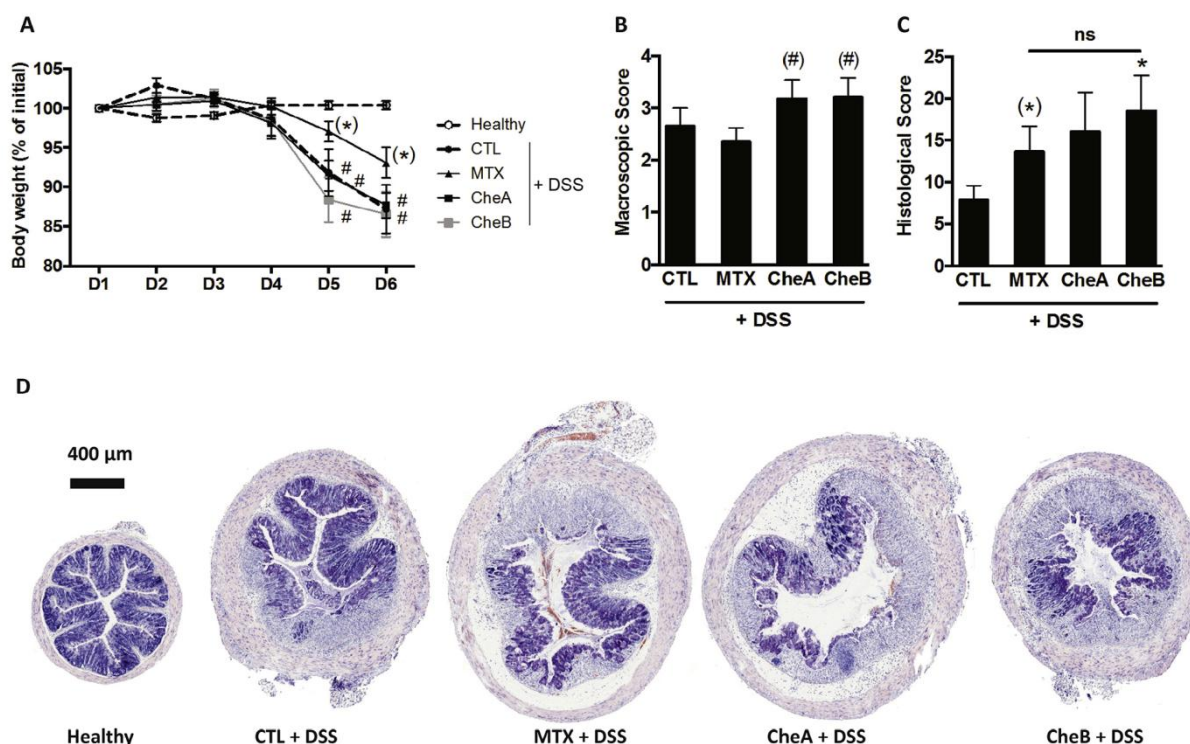


Fig. 2 – Impact of dietary cheeses on 7-day DSS colitis in mice. (A) Body weight loss (as a percentage of the initial weight) in the healthy, PBS control (CTL), milk matrix (MTX), cheese A (CheA) and cheese B (CheB) groups. **(B)** Macroscopic scores. **(C)** Microscopic scores. The data represent the mean ($\pm$ SD) of 10 mice per group. * $p < 0.05$ vs. the control group; (#) $0.05 < p < 0.1$ vs. the control group; # $p < 0.05$ vs. the MTX group; (*) $0.05 < p < 0.1$ vs. the MTX group). **(D)** Representative histologic preparations of the colon (May–Grünwald–Giemsa staining) from mice from the various groups. Scale bars: 400 μ m.

containing an overall more neutral/less anti-inflammatory consortium of strains) showed exacerbated signs of colitis. This was evidenced by a significant ($p < 0.05$) increase in weight loss (by up to 20%), a significantly higher disease score, greater colonic MPO activity, greater expression of inflammatory genes (Fig. 3D–F) and more pronounced pathological features (Fig. 3G). Hence, the rate of progression of colitis and the intensity of inflammation were significantly higher in the CheA group than in CheB group ($p < 0.05$).

4. Discussion

In the present study, we addressed the immunostimulatory diversity among microorganism mixes and thus the potential impact of the widely consumed, live, food-borne microbes found in cheese-ripening ecosystems. Our results clearly showed that bacterial and yeast consortia are not immunologically inert *in vitro*. Based on the immunomodulatory profiles of individual microbial strains, the immune response associated with the reconstituted mixtures could be predicted to some extent (at least for the IL-10 read-out). Although removing an anti-inflammatory strain from an anti-inflammatory cocktail may appear empiric and cannot necessarily be generalized to other

situations, this approach seems to preserve the overall anti-inflammatory balance. Adding or changing an immune-enhancing strain may reverse or lower the immunomodulatory response.

As previously shown by our group (Foligne et al., 2007a, 2007b), screening for probiotics with PBMCs (based on the IL-10/IL-12 ratio) is mostly predictive of *in vivo* anti-inflammatory efficacy, especially in the TNBS model of colitis. This correlation was less clear in the DSS mouse model of chemically induced experimental colitis. Although these models mimic some (but not all) of the aspects of human IBD and thus must be interpreted with caution, they are useful for studying probiotic–host interactions (Claes, De Keersmaecker, Vanderleyden, & Lebeer, 2011). The acute DSS colitis model appears to be more appropriate for assessing epithelial barrier function and microbial translocation. In contrast, immunocompetent T and B cells are required for the onset of hapten-induced colitis in the TNBS model. Furthermore, the DSS model also evokes features associated with Th2-like colitis and UC. Thus, it is not surprising that some treatments or nutritional intervention(s) may be protective in one model but not in another (as observed for smoking risk factors in CD vs. UC and in TNBS vs. DSS models (Montbarbon et al., 2013). We also observed that some yeasts might be able to alleviate colitis even though they did not induce high cytokine levels *in vitro*; this suggests that

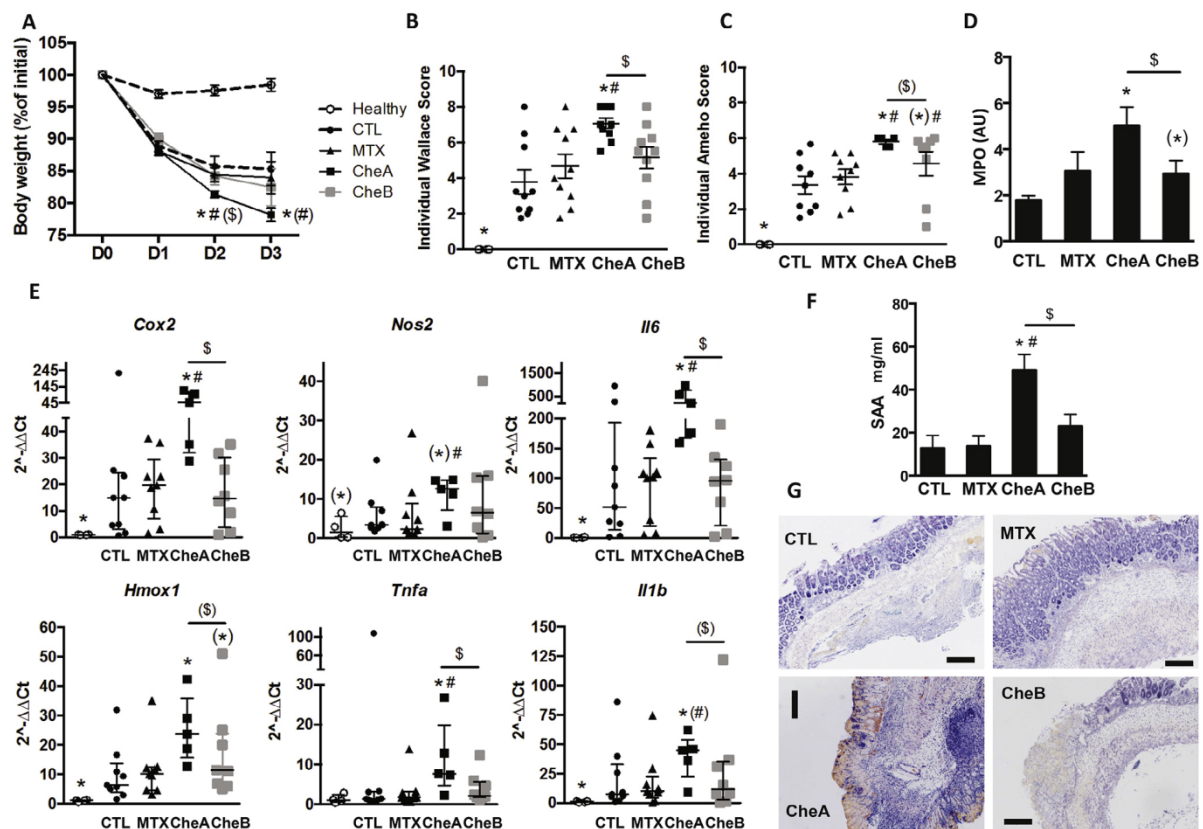


Fig. 3 – Impact of dietary cheeses on 3-day TNBS colitis in mice. (A) Body weight loss (as a percentage of the initial weight) in the healthy, PBS control (CTL), milk matrix (MTX), cheese A (CheA) and cheese B (CheB) groups. **(B)** Wallace macroscopic scores. **(C)** Ameho histological scores. **(D)** Myeloperoxidase activity (MPO). **(E)** Transcription of inflammatory genes in the colon. **(F)** Serum amyloid A protein (SAA) levels. The data represent the mean ($\pm$ SD) of 10 mice per group, (* $p < 0.05$ vs. the control group; (*) $0.05 < p < 0.1$ vs. the control group; # $p < 0.05$ vs. the MTX group; (#) $0.05 < p < 0.1$ vs. the MTX group; \$ $p < 0.05$ vs. the CheA group; (\$) $0.05 < p < 0.1$ vs. the MTX group. **(G)** Representative histologic preparations of the colon (May–Grünwald–Giemsa staining) from mice from the various groups. Scale bars: 200 μ m.

the yeast's impact on inflammation was correlated with epithelial cell signaling (Foligné et al., 2010). Our present results have clearly established that *in vitro* immunoprofiling of human PBMCs is a powerful tool for screening food-borne bacteria and foodborne ecosystems containing high proportions of fungi, Gram-positive bacteria and Gram-negative bacteria, extending previous data from pure cultures to mixtures.

The present study's main objective was to determine whether the microbial composition of a fermented diet modified the inflammation in murine models. Given that the various microbial consortia had similar cell counts, metabolic pathways and survival aptitudes in the gut, the main phenotypic differences were related to immune determinants. However, the impact of the two "opposite" cheeses on the resident microbiota needs to be explored further, in order to characterize and understand the role(s) of cheese-derived microorganisms in IBD. Furthermore, models of T-cell-mediated colitis based on the adoptive transfer of T cells in immunodeficient mice (a Th1-type cytokine-mediated hyperresponse model known to be modulated by the gut microbiota and

probiotics (Philippe et al., 2011) are likely to provide valuable information prior to clinical studies. In a view to consider the design of functional foods, the whole physiology of the various strains, considering the survival of strains in the product (Tripathi & Giri, 2014), adhesion to epithelial cells (Monteagudo-Mera et al., 2012), immune profile and regulatory mechanisms of microorganisms (Ashraf, Vasiljevic, Day, Smith, & Donkor, 2014), alone and in combination, have to be taken into account, together with metabolites and the occurrence of milk-derived peptides, that can be either anti- (Korhonen, 2009) or pro-inflammatory (Ul Haq, Kapila, & Saliganti, 2014). Then the final product can be evaluated in reliable models for disease's susceptibility.

In conclusion, the present results further improve our knowledge of the biological activities of cheese-ripening microflora in IBD. Extrapolation of the results of nutritional and inflammatory studies in mice to humans is problematic (Leist & Hartung, 2013; Seok et al., 2013), and further robust epidemiological and clinical studies in humans are required. However, in view of the massive intake of microorganisms through cheese

consumption, one should not neglect the microorganisms' impact on the immune balance and overall health. Pre-illness dietary habits should also be studied. On this basis, one can seek to design cheeses with anti-inflammatory properties for the prevention of colitis (either by maintaining remissions or limiting relapses). This type of ecological, microbiota-targeted therapy would complement other (often expensive) treatments. Furthermore, cheeses with immune-enhancing properties could be of value for specific application such boosting vaccine responses. Taken as a whole, our present results suggest that there are technological opportunities for cheese making in diet management, nutritional advice and food design for further benefits (Rajasekaran & Kalaivani, 2013). Seksik et al. have questioned whether dietary probiotics, prebiotics or synbiotics have a role in the treatment of patients with IBD (Seksik, Dray, Sokol, & Marteau, 2008); the same question can be asked of cheeses. The answer is "yes" but greatly depends on the individual patient and the specific etiological, immunological and microbiotic features of IBD (Colombel, Watson, & Neurath, 2008). This echoes Hippocrates' advice more than 2000 years ago: "let your food be your medicine and your medicine be your food".

Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest to disclose.

Acknowledgements

We thank Dr. Nicolas Blondiaux (Institut de Microbiologie, Lille University Medical Center, Lille, France) for managing the mass spectrometry analysis. We also thank Katharina Mann-Baërt and Michael Enthall for fruitful advice.

Appendix: Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at [doi:10.1016/j.jff.2014.11.021](https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.11.021).

REFERENCES

- Ameho, C. K., Adjei, A. A., Harrison, E. K., Takeshita, K., Morioka, T., Arakaki, Y., Ito, E., Suzuki, I., Kulkarni, A. D., Kawajiri, A., & Yamamoto, S. (1997). Prophylactic effect of dietary glutamine supplementation on interleukin 8 and tumor necrosis factor alpha production in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis. *Gut*, 41, 487–493.
- Araujo, R., Rodrigues, A. G., & Pina-Vaz, C. (2004). A fast, practical and reproducible procedure for the standardization of the cell density of an *Aspergillus* suspension. *Journal of Medical Microbiology*, 53, 783–786.
- Ashraf, R., Vasiljevic, T., Day, S. L., Smith, S. C., & Donkor, O. N. (2014). Lactic acid bacteria and probiotic organisms induce different cytokine profile and regulatory T cells mechanisms. *Journal of Functional Foods*, 6, 395–409.
- Aune, D., Lau, R., Chan, D. S., Vieira, R., Greenwood, D. C., Kampman, E., & Norat, T. (2012). Dairy products and colorectal cancer risk: A systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Annals of Oncology*, 23, 37–45.
- Bach, J. F. (2002). The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *New England Journal of Medicine*, 347, 911–920.
- Beermann, C., & Hartung, J. (2013). Physiological properties of milk ingredients released by fermentation. *Food & Function*, 4, 185–199.
- Birrenbach, T., & Bocker, U. (2004). Inflammatory bowel disease and smoking: A review of epidemiology, pathophysiology, and therapeutic implications. *Inflammatory Bowel Diseases*, 10, 848–859.
- Blondiaux, N., Gaillot, O., & Courcol, R. J. (2010). MALDI-TOF mass spectrometry to identify clinical bacterial isolates: Evaluation in a teaching hospital in Lille. *Pathologie-Biologie*, 58, 55–57.
- Bradley, P. P., Priebat, D. A., Christensen, R. D., & Rothstein, G. (1982). Measurement of cutaneous inflammation: Estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *The Journal of Investigative Dermatology*, 78, 206–209.
- Chapman, C. M., Gibson, G. R., & Rowland, I. (2011). Health benefits of probiotics: Are mixtures more effective than single strains? *European Journal of Nutrition*, 50, 1–17.
- Claes, I. J., De Keersmaecker, S. C., Vanderleyden, J., & Lebeer, S. (2011). Lessons from probiotic-host interaction studies in murine models of experimental colitis. *Molecular Nutrition and Food Research*, 55, 1441–1453.
- Clarke, J. O., & Mullin, G. E. (2008). A review of complementary and alternative approaches to immunomodulation. *Nutrition in Clinical Practice*, 23, 49–62.
- Colombel, J. F., Watson, A. J., & Neurath, M. F. (2008). The 10 remaining mysteries of inflammatory bowel disease. *Gut*, 57, 429–433.
- Cosnes, J. (2004). Tobacco and IBD: Relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology*, 18, 481–496.
- David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., Ling, A. V., Devlin, A. S., Varna, Y., Fischbach, M. A., Biddinger, S. B., Dutton, R. J., & Turnbaugh, P. J. (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 505, 559–563.
- Drouault-Holowacz, S., Foligné, B., Dennin, V., Goudercourt, D., Terpend, K., Burckel, A., & Pot, B. (2006). Anti-inflammatory potential of the probiotic dietary supplement Lactibiane Tolérance: *In vitro* and *in vivo* considerations. *Clinical Nutrition: Official Journal of the European Society of Parenteral and Enteral Nutrition*, 25, 994–1003.
- Foligné, B., Daniel, C., & Pot, B. (2013). Probiotics from research to market: The possibilities, risks and challenges. *Current Opinion in Microbiology*, 16, 284–292.
- Foligné, B., Dewulf, J., Vandekerckove, P., Pignède, G., & Pot, B. (2010). Probiotic yeasts: Anti-inflammatory potential of various non-pathogenic strains in experimental colitis in mice. *World Journal of Gastroenterology*, 16, 2134–2145.
- Foligne, B., Dessein, R., Marceau, M., Poirer, S., Chamaillard, M., Pot, B., Simonet, M., & Daniel, C. (2007a). Prevention and treatment of colitis with *Lactococcus lactis* secreting the immunomodulatory *Yersinia* LcrV protein. *Gastroenterology*, 133, 862–874.
- Foligne, B., Nutton, S., Grangette, C., Dennin, V., Goudercourt, D., Poirer, S., Dewulf, J., Brassart, D., Mercenier, A., & Pot, B. (2007b). Correlation between *in vitro* and *in vivo* immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World Journal of Gastroenterology*, 13, 236–243.
- Gentschew, L., & Ferguson, L. R. (2012). Role of nutrition and microbiota in susceptibility to inflammatory bowel diseases. *Molecular Nutrition and Food Research*, 56, 524–535.

- Gionchetti, P., Calafiore, A., Pratico, C., Laureti, S., Vitali, G., Poggioli, G., Campieri, M., & Rizzello, F. (2012). Randomized controlled trials in pouchitis. *Reviews on Recent Clinical Trials*, 7, 303–306.
- Hart, A. L., Lammers, K., Brigidi, P., Vitali, B., Rizzello, F., Gionchetti, P., Campieri, M., Kamm, M. A., Knight, S. C., & Stagg, A. J. (2004). Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. *Gut*, 53, 1602–1609.
- Hartmann, G., Bidlingmaier, C., Siegmund, B., Albrich, S., Schulze, J., Tschoep, K., Eigler, A., Lehr, H. A., & Endres, S. (2000). Specific type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram mitigates experimental colitis in mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 292, 22–30.
- Hoarau, C., Martin, L., Faugaret, D., Baron, C., Dauba, A., Aubert-Jacquín, C., Velge-Roussel, F., & Lebranchu, Y. (2008). Supernatant from bifidobacterium differentially modulates transduction signaling pathways for biological functions of human dendritic cells. *PLoS ONE*, 3, e2753.
- Hosoya, T., Ogawa, A., Sakai, F., & Kadooka, Y. (2012). A cheese-containing diet modulates immune responses and alleviates dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. *Journal of Dairy Science*, 95, 2810–2818.
- Khosravi, A., Yáñez, A., Price, J. G., Chow, A., Merad, M., Goodridge, H. S., & Mazmanian, S. K. (2014). Gut microbiota promote hematopoiesis to control bacterial infection. *Cell Host & Microbe*, 15, 374–381.
- Korhonen, H. (2009). Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of Functional Foods*, 1, 177–187.
- Labonte, M. E., Couture, P., Richard, C., Desroches, S., & Lamarche, B. (2013). Impact of dairy products on biomarkers of inflammation: A systematic review of randomized controlled nutritional intervention studies in overweight and obese adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 97, 706–717.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. C. (2010). Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: Comparison with commensals and pathogens. *Nature Reviews. Microbiology*, 8, 171–184.
- Leist, M., & Hartung, T. (2013). Inflammatory findings on species extrapolations: Humans are definitely no 70-kg mice. *Archives of Toxicology*, 87, 563–567.
- López, P., Gueimonde, M., Margolles, A., & Suárez, A. (2010). Distinct Bifidobacterium strains drive different immune responses in vitro. *International Journal of Food Microbiology*, 138, 157–165.
- Maccacferri, S., Klinder, A., Brigidi, P., Cavina, P., & Costabile, A. (2012). Potential probiotic *Kluyveromyces marxianus* B0399 modulates the immune response in Caco-2 cells and peripheral blood mononuclear cells and impacts the human gut microbiota in an in vitro colonic model system. *Applied and Environmental Microbiology*, 8, 956–964.
- Maconi, G., Ardizzone, S., Cucino, C., Bezzio, C., Russo, A. G., & Bianchi Porro, G. (2010). Pre-illness changes in dietary habits and diet as a risk factor for inflammatory bowel disease: A case-control study. *World Journal of Gastroenterology*, 16, 4297–4304.
- Marteau, P., Lepage, P., Mangin, I., Suau, A., Doré, J., Pochart, P., & Seksik, P. (2004). Review article: Gut flora and inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 20, 18–23.
- Montbarbon, M., Pichavant, M., Langlois, A., Erdual, E., Maggiotto, F., Neut, C., Mallevaey, T., Dharancy, S., Dubuquoy, L., Trottein, F., Cortot, A., Desreumaux, P., Gosset, P., & Bertin, B. (2013). Colonic inflammation in mice is improved by cigarette smoke through iNKT cells recruitment. *PLoS ONE*, 8, e62208.
- Monteagudo-Mera, A., Rodríguez-Aparicio, L., Rúa, J., Martínez-Blanco, H., Navasa, N., García-Armesto, M. R., & Ferrero, M. A. (2012). In vitro evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. *Journal of Functional Foods*, 4, 531–541.
- Mounier, J., Gelsomino, R., Goerges, S., Vancanney, M., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., Scherer, S., Swings, J., Fitzgerald, G. F., & Cogan, T. M. (2005). Surface microflora of four smear-ripened cheeses. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 6489–6500.
- Ng, S. C., Bernstein, C. N., Vatn, M. H., Lakatos, P. L., Loftus, E. V., Jr., Tysk, C., O'Morain, C., Moum, B., & Colombel, J. F. (2013). Geographical variability and environmental risk factors in inflammatory bowel disease. Epidemiology and Natural History Task Force of the International Organization of Inflammatory Bowel Disease (IOIBD). *Gut*, 62, 630–649.
- Nova, E., Wörnberg, J., Gómez-Martínez, S., Díaz, L. E., Romeo, J., & Marcos, A. (2007). Immunomodulatory effects of probiotics in different stages of life. *The British Journal of Nutrition*, 1, S90–S95.
- Peran, L., Camuesco, D., Comalada, M., Nieto, A., Concha, A., Diaz-Ropero, M. P., Olivares, M., Xaus, J., Zarzuelo, A., & Galvez, J. (2005). Preventative effects of a probiotic, *Lactobacillus salivarius* ssp. *salivarius*, in the TNBS model of rat colitis. *World Journal of Gastroenterology*, 11, 5185–5192.
- Petrof, E. O., Claud, E. C., Gloor, G. B., & Allen-Vercoe, E. (2013). Microbial ecosystems therapeutics: A new paradigm in medicine? *Beneficial Microbes*, 4, 53–65.
- Philippe, D., Favre, L., Foata, F., Adolfsen, O., Perruisseau-Carrier, G., Vidal, K., Reuteler, G., Dayer-Schneider, J., Mueller, C., & Blum, S. (2011). *Bifidobacterium lactis* attenuates onset of inflammation in a murine model of colitis. *World Journal of Gastroenterology*, 17, 459–469.
- Rachmilewitz, D., Katakura, K., Karmeli, F., Hayashi, T., Reinus, C., Rudensky, B., Akira, S., Takeda, K., Lee, J., Takabayashi, K., & Raz, E. (2004). Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology*, 126, 520–528.
- Rahman, A., Gleinser, M., Lanhers, M. C., Riedel, C. U., Foligné, B., Hanse, M., Yen, F. T., Klouj, A., Afzal, M., Back, A., Mangavel, C., Cailliez-Grimal, C., Revol-Junelles, A. M., & Borges, F. (2013). Survival of the psychrotrophic bacterium *Carnobacterium maltaromaticum* LMA 28 in the mice gastrointestinal tract, adhesion and immune consideration to human cells. *International Dairy Journal*, 34, 93–99.
- Rajasekaran, A., & Kalaivani, M. (2013). Designer foods and their benefits: A review. *Journal of Food Science and Technology*, 50, 1–16.
- Rajendran, N., & Kumar, D. (2010). Role of diet in the management of inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, 16, 1442–1448.
- Riedel, C. U., Foata, F., Philippe, D., Adolfsen, O., Eikmanns, B. J., & Blum, S. (2006). Anti-inflammatory effects of bifidobacteria by inhibition of LPS-induced NF-kappaB activation. *World Journal of Gastroenterology*, 12, 3729–3735.
- Romanin, D., Serradell, M., González Maciel, D., Lausada, N., Garrote, G. L., & Rumbo, M. (2010). Down-regulation of intestinal epithelial innate response by probiotic yeasts isolated from kefir. *International Journal of Food Microbiology*, 140, 102–108.
- Roselli, M., Finamore, A., Nuccitelli, S., Carnevali, P., Brigidi, P., Vitali, B., Nobili, F., Rami, R., Garaguso, I., & Mengheri, E. (2009). Prevention of TNBS-induced colitis by different *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains is associated with an expansion of gamma delta T and regulatory T cells of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Inflammatory Bowel Diseases*, 15, 1526–1536.
- Seksik, P., Dray, X., Sokol, H., & Marteau, P. (2008). Is there any place for alimentary probiotics, prebiotics or synbiotics, for patients with inflammatory bowel disease? *Molecular Nutrition and Food Research*, 52, 906–912.

- Seok, J., Warren, H. S., Cuenca, A. G., Mindrinos, M. N., Baker, H. V., Xu, W., Richards, D. R., McDonald-Smith, G. P., Gao, H., Hennessy, L., Finnerty, C. C., López, C. M., Honari, S., Moore, E. E., Minei, J. P., Cuschieri, J., Bankey, P. E., Johnson, J. L., Sperry, J., Nathens, A. B., Billiar, T. R., West, M. A., Jeschke, M. G., Klein, M. B., Gamelli, R. L., Gibran, N. S., Brownstein, B. H., Miller-Graziano, C., Calvano, S. E., Mason, P. H., Cobb, J. P., Rahme, L. G., Lowry, S. F., Maier, R. V., Moldawer, L. L., Herndon, D. N., Davis, R. W., Xiao, W., & Tompkins, R. G. (2013). Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 3507–3512.
- Stanton, C., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Van Sinderen, D. (2005). Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Current Opinion in Biotechnology*, 16, 198–203.
- Timmerman, H. M., Koning, C. J., Mulder, L., Rombouts, F. M., & Beynen, A. C. (2004). Monostrain, multistain and multispecies probiotics: A comparison of functionality and efficacy. *International Journal of Food Microbiology*, 96, 219–233.
- Timmerman, H. M., Niers, L. E., Ridwan, B. U., Koning, C. J., Mulder, L., Akkermans, L. M., Rombouts, F. M., & Rijkers, G. T. (2007). Design of a multispecies probiotic mixture to prevent infectious complications in critically ill patients. *Clinical Nutrition: Official Journal of the European Society of Parenteral and Enteral Nutrition*, 26, 450–459.
- Tripathi, M. K., & Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, 9, 225–241.
- Ul-Haq, M. R., Kapila, R., & Saliganti, V. (2014). Consumption of β -casomorphins-7/5 induce inflammatory immune response in mice gut through Th2 pathway. *Journal of Functional Foods*, 8, 150–160.
- van Baarlen, P., Wells, J. M., & Kleerebezem, M. (2013). Regulation of intestinal homeostasis and immunity with probiotic lactobacilli. *Trends in Immunology*, 34, 208–215.
- Viladomiu, M., Hontecillas, R., Yuan, L., Lu, P., & Bassaganya-Riera, J. (2013). Nutritional protective mechanisms against gut inflammation. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24, 929–939.
- Wallace, J. L., MacNaughton, W. K., Morris, G. P., & Beck, P. L. (1989). Inhibition of leukotriene synthesis markedly accelerates healing in a rat model of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 96, 29–36.
- Zvirbliene, A., Kiudelis, G., Zalinkevicius, R., & Kupcinskas, L. (2006). Dietary characteristics of patients with inflammatory bowel diseases. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 42, 895–899.

L'industrie agroalimentaire utilise une grande diversité de micro-organismes lors de la fabrication d'aliments fermentés tels que le fromage. La plupart de ces micro-organismes sont vivants lors de leur ingestion. En partant de ce constat, notre travail a eu pour objectif d'étudier la réponse au stress digestif de micro-organismes issus du microbiote de fromage à pâte molle ainsi que de caractériser leur potentiel immunomodulateur.

La première partie de ce travail a consisté à investiguer la résistance au stress digestif d'une sélection de 35 micro-organismes (bactéries, levures et un champignon filamenteux). Pour cela, nous avons conçu une méthode de digestion *in vitro* en trois étapes consistant en une exposition aux stress rencontrés respectivement dans (i) l'estomac, (ii) le duodénum, (iii) l'estomac puis le duodénum. Dans le même temps, nous avons déterminé le potentiel immunomodulateur *in vitro* de ces micro-organismes en utilisant des PBMCs. Les résultats ont montré une forte résistance aux stress digestifs *in vitro* de la part des levures. Les bactéries ont donné des résultats plus contrastés. Les profils PBMCs ont donné les levures comme plutôt anti-inflammatoires (à l'exception d'une espèce) tandis que les bactéries ont répondu de manière plus contrastée avec des profils parfois différents au sein d'une même espèce.

La seconde partie des travaux a permis de développer le Digesteur Dynamique Gastro-Intestinal (DIDGI) et à utiliser une sélection réduite de micro-organismes pour aborder l'influence de leur croissance en condition d'affinage sur leur capacité à résister au stress digestif. Dans le même temps, nous avons évalué la résistance à la digestion de ce même microbiote *in vivo* (modèle murin). La croissance en fromage a eu une incidence sur certaines bactéries et levures quant à leur capacité à survivre aux expérimentations DIDGI. Une part importante des micro-organismes utilisés a conservé sa viabilité après ingestion par des souris.

La troisième partie de ce travail a consisté à (i) fabriquer deux fromages dont les microbiotes possédaient, *a priori*, des profils immunomodulateurs opposés puis à (ii) nourrir des souris auxquelles nous avons provoqué deux types de colites. Dans le premier modèle, les symptômes ont été (en tendance) légèrement exacerbés, quel que soit le profil immunomodulateur du fromage. Dans le second modèle, le fromage "pro-inflammatoire" a significativement aggravé les symptômes de la colite.

La quatrième et dernière partie des travaux a consisté à caractériser la réponse moléculaire d'une bactérie à Gram-positif et d'une bactérie à Gram-négatif. Pour cela, le même type d'approche "stress digestif batch" que dans la première partie de la thèse, a été retenue, couplée à une analyse du transcriptome après séquençage RNAseq. Les résultats ont montré que les deux bactéries pouvaient sur-réguler ou sous-réguler une part importante de leur métabolisme. D'après cette analyse préliminaire, nous avons identifié des mécanismes communs aux deux bactéries ainsi qu'un certain nombre de réponses semblant plus spécifiques au sein de chacune des deux espèces.

Mots-clés : Microbiote fromager, stress digestif, digestion *in vitro*, immunomodulation, PBMCs, modèle de colite murin TNBS et DSS, transcriptome

Worldwide, the Food Industry uses a broad range of microorganisms while making fermented products, like cheese, most of microorganisms being alive when the food is consumed. Our work aimed at studying the digestive stress response of the surface-ripened cheese microflora and at characterizing their potential immunomodulative properties.

In the first part of this work, we investigated the resistance to digestive stress of a selection of 35 microorganisms (bacteria, yeasts and one fungus). We designed a three-step *in vitro* digestive batch experiment mimicking stresses encountered in (i) the stomach, (ii) the duodenum, (iii) the stomach followed by the duodenum. Alongside, we determined *in vitro* the microorganisms immunomodulating properties using PBMCs. Batch stress experiments results showed a strong resistance of yeasts to both gastric and duodenal stresses. Bacteria results were more contrasted. PBMCs profiles showed an overall anti-inflammatory response for yeasts (with the exception of one species) while bacteria profiles were fairly different, with both pro- and anti-inflammatory profiles among the same species.

The second part of the work consisted in developing a Dynamic Gastro-Intestinal Digestive system (DIDGI) and to experiment on a reduced selection of microorganisms and to assess the influence of the growth under real ripening conditions on the ability of microorganisms to withstand digestive stress. Alongside, we tracked the microorganisms' ability to survive the mouse digestive tract. Some microorganisms grown in cheeses showed fairly different responses during DIDGI experiments compared to lab-cultured microorganisms. A significant part of microorganisms was able to survive the digestive tract of mice.

The third part of the work dealt with the microbial ecosystems' influence on the host's immune responses by (i) designing experimental smear-ripened cheeses with mix of microorganisms that had rather pro- or rather anti-inflammatory immunomodulatory profiles and (ii) fed the ripened cheeses to mice with standardized microbiota. The effect of cheeses consumption on two different models of acute colitis was investigated. Results showed that both cheeses tend to exacerbate the symptoms in one of the colitis model and that the "pro-inflammatory" cheese significantly aggravated the symptoms of the second model of colitis.

The fourth and last part of the work consisted in characterizing the molecular response to a similar *in vitro* batch digestive stress used in the first part of the work. Therefore, we selected a Gram-positive bacterium and a Gram-negative bacterium and used RNAseq for transcriptome analysis. A preliminary analysis of the results showed that both organisms were able to up- or down-regulate a major part of their metabolism, using both similar mechanisms and specific response per bacterium.

Keywords : Cheese microbiota, digestive stress, *in vitro* dynamic digestion, immunomodulation, PBMCs, TNBS and DSS mice model of colitis, transcriptome