



HAL
open science

Etude du quorum sensing chez *Propionibacterium freudenreichii*

Alicia Monfort, Gwénaél Jan

► **To cite this version:**

Alicia Monfort, Gwénaél Jan. Etude du quorum sensing chez *Propionibacterium freudenreichii*. Microbiologie et Parasitologie. 2022. hal-03712789

HAL Id: hal-03712789

<https://hal.inrae.fr/hal-03712789>

Submitted on 4 Jul 2022

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License



UNIVERSITE DE RENNES I
(U.F.R. Sciences de la Vie et de l'Environnement)



UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE
(U.F.R. des Sciences)

MASTER SCIENCES, TECHNOLOGIES, SANTE

Mention MICROBIOLOGIE

Parcours
Microbiologie Fondamentale et Appliquée

2021-2022

Etude du quorum sensing chez *Propionibacterium freudenreichii*

Mémoire présenté le 21 Juin 2022

Par Alicia MONFORT

Maitre de stage : Mr Gwénaél JAN
Co-encadrant : Mme Hélène FALENTIN

Stage effectué au Laboratoire de l'INRAE, Institut Agro, UMR 1253 STLO, Rennes, France



Présentation technique du stage

Ce stage a été effectué dans le cadre de la 2ème année de Master Microbiologie Fondamentale et Appliquée en collaboration avec l'Université de Bretagne Occidentale au cours de l'année universitaire 2021/2022. Le sujet du stage est l'étude du quorum sensing chez *Propionibacterium freudenreichii*. Le stage a été effectué par Alicia MONFORT, encadré par Monsieur Gwénaél JAN et co-encadré par Madame Hélène FALENTIN. Il a été effectué au Laboratoire de l'UMR 1253 STLO, « Science et technologie du lait et de l'œuf », INRAE, l'Institut Agro, (ex-Agrocampus Ouest), 65 Rue de Saint-Brieuc, 35000 Rennes, du 3 Janvier 2022 au 8 Juillet 2022.

Remerciements

Je remercie tout d'abord M. Yves LE LOIR, directeur de l'UMR STLO, de m'avoir accueilli au sein du laboratoire, ainsi que M. Éric GUEDON, qui m'a permis d'effectuer ce stage dans son équipe.

Je tiens à remercier chaleureusement M. Gwénaél JAN et Mme Hélène FALENTIN pour leur gentillesse, leur patience et leur soutien quand j'ai été au plus bas. Mais également pour avoir toujours été disponible et m'avoir consacré du temps malgré leurs emplois du temps chargés et pour les enseignements qu'ils m'ont prodigué au cours de ces six mois pour m'améliorer et qui en ont fait une expérience très enrichissante et agréable pour moi.

Je remercie Mme Sandrine PARAYRE pour toute l'aide qu'elle m'a apporté pendant toute la durée du stage et en particulier merci à elle d'avoir effectué mes numérations bactériennes pour me permettre d'aller faire d'autres expériences à Nantes. Je remercie également Mme Sandrine PERON et Mme Nadejda BERKOVA pour la très bonne ambiance dans le bureau et pour vos différents conseils.

Je tiens également à remercier les filles de Nantes (Mme Lénaïg BRULE et Mme Marie-France PILET) de l'UMR SECALIM, INRAE, pour m'avoir accueilli dans leurs locaux et d'avoir partagé avec moi leurs connaissances sur l'analyse en bioluminescence et sur le Quorum sensing.

Enfin un grand merci à toute l'équipe MICROBIO et les membres du STLO, ainsi que tous les stagiaires et doctorants, pour votre accueil formidable et pour tous ces très bon moments passés ensemble.

Sommaire

Liste des figures et des tableaux.....	
Liste des abréviations.....	
Introduction bibliographique.....	1
1) <i>Propionibacterium freudenreichii</i> :	1
2) <i>Quorum Sensing</i> :	2
a) Définition.....	3
b) Le <i>Quorum Sensing</i> chez les bactéries Gram négatif et les Gram positif :.....	3
c) Le <i>Quorum Sensing</i> chez les Actinobacteria :	6
d) Le <i>Quorum Sensing</i> chez les Propionibacteriaceae :	7
3) <i>Impact des stress sur le Quorum Sensing</i> :.....	7
4) <i>Objectif de l'étude</i> :	8
Matériels et méthodes	8
1) <i>Conditions de culture de Propionibacterium freudenreichii</i>	8
2) <i>Dénombrements bactériens</i> :.....	8
3) <i>Analyse de bioluminescence et spectrométrie de masse</i> :.....	9
4) <i>Extraction d'ADN</i> :.....	9
5) <i>Extraction d'ARN</i> :	9
6) <i>Analyse de qualité des ARN extraits</i> :.....	10
7) <i>Rétro-transcription</i> :.....	11
8) <i>PCR quantitative (qPCR) des échantillons</i> :.....	12
a) <i>Analyse quantitative absolue</i> :.....	12
b) <i>Analyse quantitative relative</i> :.....	13
9) <i>Challenge aux stress</i> :.....	14
10) <i>Analyse statistique</i> :	15
Résultats et Discussion.....	15
1) <i>Courbes de croissance de Propionibacterium freudenreichii</i> :.....	15
2) <i>Etude des efficacités des couples d'amorces</i> :	16
3) <i>Expression du gène lux S au cours du temps</i> :.....	18
4) <i>Analyse de bioluminescence et spectrométrie de masse</i> :.....	20
5) <i>Challenge aux stress</i> :.....	22
Conclusion finale et prospective	26
Bibliographiques	27

Liste des figures et des tableaux

Figure 1 : Métabolisme carboné central chez <i>Propionibacterium freudenreichii</i>	2
Figure 2 : Représentation des mécanismes de Quorum Sensing chez les bactéries.....	3
Figure 3 : Voie de biosynthèse des AI-2 et des homosérines lactone (HSL).....	5
Figure 4 : Représentation de la voie du Quorum Sensing médiée par le système LuxS/AI-2 chez <i>Vibrio harveyi</i> et <i>Salmonella spp.</i>	6
Figure 5 : Mécanisme du Quorum Sensing chez <i>Streptomyces griseus</i>	7
Figure 6 : Les différentes étapes à effectuer pour le contrôle qualité des extraits d'ARN.....	10
Figure 7 : Différentes stratégies possibles pour convertir les ARN en ADN complémentaire (ADNc).....	11
Figure 8 : Analyse des RT-Qpcr sur le logiciel CFX Manager.....	13
Figure 9 : Cinétiques de croissance et courbes de suivi de pH de la souche <i>Propionibacterium freudenreichii</i> CIRM-BIA 1 et CIRM-BIA 129.....	16
Tableau 1 : Tableaux résumant les couples d'amorces testés avec les séquences forward et reverse, la concentration utilisée ainsi que l'efficacité d'amplification obtenue par PCR quantitative, pour la souche <i>Propionibacterium freudenreichii</i> CIRM-BIA 1 (A) et CIRM-BIA 129 (B).....	17
Tableau 2 : Tableau résumant la quantité, la pureté, l'intégrité des ARN extraits à différents temps de croissance (24 h, 48 h, 72 h et 96 h) des souches CIRM-BIA 1 et CIRM-BIA 129, ainsi que le taux de contamination par de l'ADN pour chaque extraits.	18
Figure 10 : Niveau d'expression du gène <i>luxS</i> de la souche <i>P. freudenreichii</i> CIRM-BIA 1 au cours du temps.	19
Figure 11 : Niveau d'expression du gène <i>luxS</i> de la souche <i>P. freudenreichii</i> CIRM-BIA 129 au cours du temps.....	20
Figure 12 : Détection des molécules AI-2 par bioluminescence et courbe de croissance en UFC/mL sur 96 heures de culture.....	21
Figure 13 : Concentration du DPD (4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione), précurseur des molécules AI-2, et courbe de croissance en UFC/mL sur 96 heures de culture.	21
Tableau 3 : Tableau résumant la quantité, la pureté, l'intégrité des ARN extraits des souches CIRM-BIA 1 et CIRM-BIA 129 après application de différents stress, ainsi que le taux de contamination par de l'ADN pour chaque extrait.	23
Figure 14 : Niveau d'expression du gène <i>luxS</i> de la souche <i>P. freudenreichii</i> CIRM-BIA 1 après 4 heures d'incubation dans différents milieux « stressant » (osmotique – 0,3 M NaCl, salin – 0,2 g/L SB et acide – pH 4,9) ainsi que dans milieu contrôle PUF.....	24
Figure 15 : Détection des molécules AI-2 par bioluminescence dans les surnageants des cultures de CIRM-BIA 1 après 4 heures d'incubation dans différents milieux « stressant ».....	25

Liste des abréviations

ACP : Acyl Carrier Protein (Protéine porteuse d'acyle)

AHL : Acyl-homosérine Lactone

AI : Auto-inducteur

AI-1 : Auto-inducteur 1

AI-2 : Auto-inducteur 2

CIRM-BIA : Centre de Ressources Biologiques pour les Microorganismes - Bactéries d'Intérêt Alimentaire

DPD : di-hydroxy-pentanedione

FDA : Food and Drug Administration

GBL : Gamma-Butyrolactone

GRAS : Generally Recognised As Safe

HSL : Homosérine lactone

MMFs : Molécules de Methyleneomycin furans

PUF : Milieu de perméat de lait ultrafiltré

QPS : Qualified Presumption of Safety

QS : Quorum Sensing

RT- qPCR : Rétro-transcription PCR quantitative

SAH : S-adenosyl homocystéine

SAM : S-adenosyl-méthionine

SRH : S-ribosyl-homocystéine

Introduction bibliographique

1) *Propionibacterium freudenreichii* :

Propionibacterium freudenreichii est une bactérie propionique laitière. Ces bactéries ont été isolées pour la première fois en 1906 par von Freudenreich et Orla-Jensen, à partir de fromages à pâte pressée cuite de type Emmental (von Freudenreich and Orla-Jensen, 1906). Les bactéries propioniques laitières sont des bactéries à Gram positif appartenant au phylum des Actinobacteria. Elles présentent un fort pourcentage en bases nucléotidiques G + C (64 à 68 %) (Cummins and Johnson, 1992). Elles sont non mobiles et non sporulantes. Ce sont des bactéries micro-aérophiles et mésophiles. Leur développement est optimal à une température de 30°C et à un pH situé entre 6,5 et 7,0 (Jan *et al.*, 2007). Dans des conditions optimales, elles ont une croissance lente avec un temps de génération d'environ 5 heures. Elles sont décrites comme de petits bacilles ou coques pléïomorphes. En effet, elles peuvent présenter des morphologies variables en fonction de la souche, de l'âge de la culture et des conditions de croissance et apparaissent isolées, en paires, courtes chaînes, ou amas.

La taille de leur génome varie en fonction des bactéries propioniques laitières. Par exemple, celui de *P.freudenreichii* CIRM-BIA 1 est composé d'un chromosome circulaire de 2,7 Mb avec un pourcentage en GC de 67 % (Falentin *et al.*, 2010).

De plus, les bactéries propioniques laitières sont chimio-organo-hétérotrophes. Elles sont capables de métaboliser divers sucres (glucose, galactose, lactose et fructose) et également des acides organiques (lactate, pyruvate) et des alcools tels que le glycérol (Wood, 1981; Thierry, 2004).

Ces bactéries, et plus précisément l'espèce *Propionibacterium freudenreichii*, sont couramment utilisées comme ferment dans l'industrie laitière et consommées en grande quantité. *Propionibacterium freudenreichii* est notamment responsable de la flaveur et de l'ouverture des Emmentals, grâce à la production de propionate, d'acétate et de CO₂, suite à la fermentation de leur substrat préférentiel, le lactate.

En effet, les bactéries propioniques possèdent la voie métabolique de Wood-Werkman (ou cycle de la transcarboxylase) qui est une composante centrale du métabolisme carboné (Figure 1). Il permet de transformer le lactate, via le pyruvate, en succinate puis en propionate.

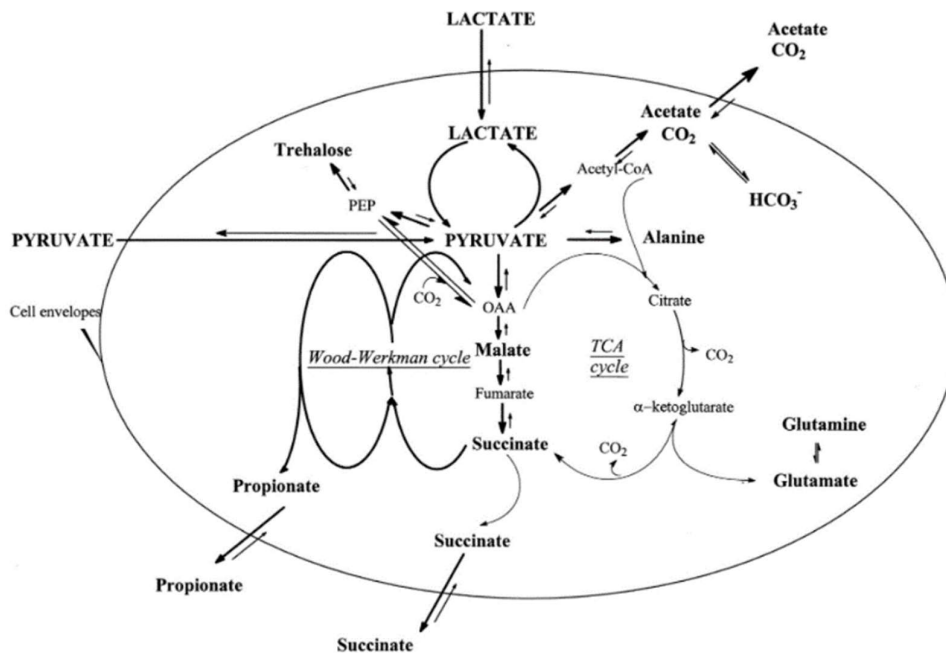


Figure 1 : Métabolisme carboné central chez *Propionibacterium freudenreichii*. (Deborde and Boyaval, 2000) Le cycle de Wood-Werkman (ou cycle de la transcarboxylase) est un élément clé du métabolisme carboné central des bactéries propioniques lactières.

Du fait de son long historique de consommation en toute sécurité (comme par exemple dans le fromage) et grâce à ces caractéristiques métaboliques, cette bactérie est reconnue comme GRAS (Generally Recognised As Safe) aux Etats-Unis par la FDA (Food and Drug Administration) (Hervé *et al.*, 2007) et bénéficie du statut QPS (Qualified Presumption of Safety) en Europe (Cousin *et al.*, 2010). *Propionibacterium freudenreichii* appartient au groupe des bactéries propioniques lactières actuellement considérées comme ayant des potentiels probiotiques (Jan *et al.*, 2001a) comme la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte (Lebeer *et al.*, 2010) et la modulation du microbiote intestinal (Cousin *et al.*, 2010).

Etant donné que *P. freudenreichii* possèdent des capacités à moduler le microbiote intestinal et la réponse immunitaire de l'hôte, on peut alors se demander si cette bactérie possède un système de communication et de perception bactérien tel que le Quorum Sensing.

2) Quorum Sensing :

La notion de Quorum Sensing (QS) a été évoquée dans les années 70 avec la découverte et la description d'un système de communication chez la bactérie marine *Aliivibrio fischeri* (anciennement *Vibrio fischeri*). Plus précisément, cette bactérie marine produit de la bioluminescence permettant à une sépiole, *Euprymna scolopes*, d'échapper à ses prédateurs (Nealson *et al.*, 1970). Cette

bioluminescence est due à l'activation de l'opéron *luxCDABE* via une forte densité des molécules signales produites par *A. fischeri* (Prescott and Decho, 2020). Ces molécules signales sont nommées « Auto-inducteurs 1 » (AI-1) et sont des acyl-homosérines lactones (Eberhard *et al.*, 1981).

Le nom de Quorum Sensing est ensuite apparu pour la première fois en 1994 (Fuqua *et al.*, 1994). Depuis, d'autres molécules signales impliquées dans les mécanismes du QS ont été mise en évidence chez des bactéries à Gram positif et négatif.

a) Définition

Le Quorum sensing est un mécanisme de communication et de perception soit entre bactéries de la même espèce et/ou soit entre bactéries d'espèces différentes (Bassler and Losick, 2006). Le QS repose sur la production de molécules médiatrices nommées « Auto-inducteurs » (AI) qui peuvent diffuser à travers la membrane et produites au cours de la croissance bactérienne. En effet, la concentration en AI, dans le milieu extracellulaire, augmente de manière proportionnelle à la densité bactérienne jusqu'à atteindre un seuil critique. Elles vont alors pénétrer dans les cellules et interagir avec un régulateur transcriptionnel qui va activer ou réprimer l'expression de gènes spécifiques (Waters and Bassler, 2005).

b) Le Quorum Sensing chez les bactéries Gram négatif et les Gram positif :

Le QS peut être présent à la fois chez les bactéries Gram négatif et positif (Parker and Sperandio, 2009).

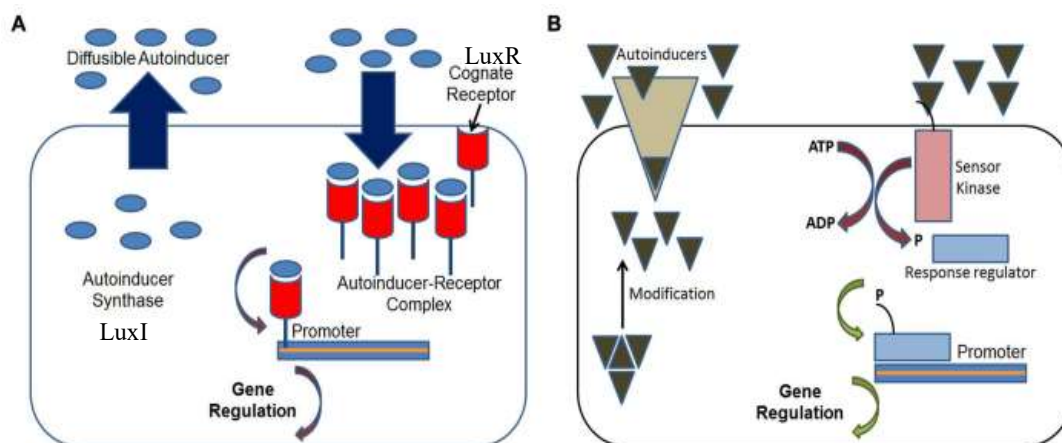


Figure 2 : Représentation des mécanismes de Quorum Sensing chez les bactéries. (Polkade et al., 2016) (A) Bactéries Gram négatif : une enzyme de la famille des LuxI catalyse la formation des molécules auto-inductrices de type N-acylhomosérine lactone (AHL). A une concentration seuil, elles seront détectées par un régulateur transcriptionnel de la famille de LuxR qui pourra réguler des gènes spécifiques. (B) Bactéries gram positif : des oligopeptides sont synthétisés et sont détectés à une concentration seuil par un système à deux composants qui induira la phosphorylation d'un régulateur et par conséquent une régulation transcriptionnelle au niveau de gènes spécifiques.

Il existe plusieurs mécanismes de QS. Un des plus décrits est celui des bactéries Gram négatif (Figure 2A). Des molécules appartenant à la famille des N-acylhomosérines lactones (AHL) sont synthétisées par une enzyme de la famille des LuxI synthases (Figure 3). Ces molécules vont jouer le rôle d'AI et sortent par diffusion simple des cellules. Quand leur concentration atteint un seuil critique, elles rentrent dans les cellules et se fixent à un récepteur homologue de LuxR qui est un régulateur transcriptionnel de gènes spécifiques (Xavier and Bassler, 2003).

Chez la plupart des bactéries Gram positif, le QS est médié par des oligopeptides auto-inducteurs (Figure 2B). Ils sont synthétisés à partir d'un peptide précurseur et sortent des cellules par transport actif. A une concentration seuil, ils sont détectés par un système à deux composants dont le senseur est une histidine kinase membranaire. La détection va entraîner une cascade de phosphorylation jusqu'au régulateur de réponse qui va ainsi réguler l'expression de gènes spécifiques en se liant aux promoteurs cibles (Sturme *et al.*, 2002).

Il existe également un signal de communication qui est universel aux bactéries Gram négatif et positif : les Auto-inducteurs 2 (AI-2) (Waters and Bassler, 2005).

L'AI-2 est synthétisé par une enzyme de type-LuxS codée par le gène *luxS*. Sa voie de biosynthèse est représentée Figure 3.

La voie de biosynthèse des AI-2 et des homosérines lactones dérive de la S-adénosyl-méthionine (SAM). Lorsque la SAM n'est pas utilisée pour synthétiser des homosérines lactones (HSL), elle sert de donneur de méthyl. En perdant son méthyl, elle devient de la S-adénosyl homocystéine (SAH) qui sera dégradée en S-ribosyl-homocystéine (SRH). Cette dernière va être hydrolysée, par l'enzyme LuxS codée par le gène *luxS*, en homocystéine et en di-hydroxy-pentanedione (DPD, précurseur de l'AI-2). Le DPD va se transformer par cyclisation spontanée en Pro-AI2 puis par ajout d'une molécule de bore (pour *Vibrio spp*) ou non (pour *Salmonella spp* ou *Escherichia coli*), en AI-2. Cette molécule AI-2 va s'accumuler de façon non enzymatique dans le milieu extracellulaire (Xavier and Bassler, 2003).

C'est donc l'accumulation du DPD dans la cellule qui permet la production de molécules AI-2. De plus, si les bactéries ne possèdent pas le gène *luxS*, elles ne synthétisent pas de DPD. Le gène *luxS* est donc nécessaire à la production de molécules AI-2.

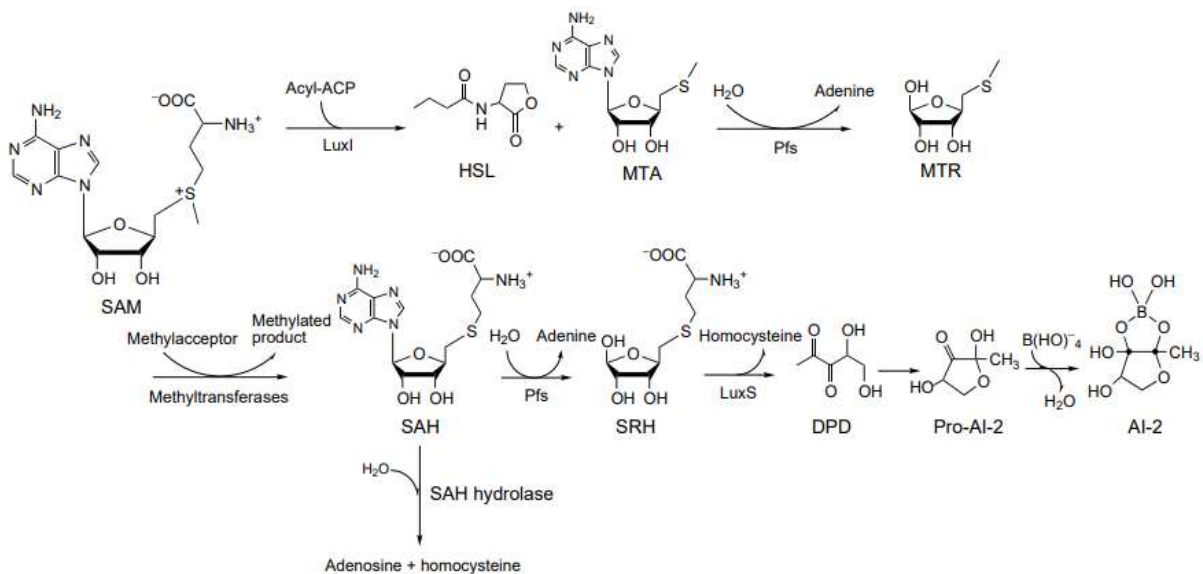


Figure 3 : Voie de biosynthèse des AI-2 et des homosérines lactones (HSL). (Xavier and Bassler, 2003) Les autoinducteurs de type HSL et AI-2 sont tous deux dérivés de la SAM. La voie de synthèse de l'HSL est montrée sur la ligne horizontale supérieure. Les enzymes de type LuxI forment les autoinducteurs de l'HSL à partir de la SAM et d'Acyl-ACP. La voie horizontale inférieure montre la biosynthèse de l'AI-2. Des méthyltransférases agissent sur la SAM et transfèrent un groupe méthyle à divers substrats. La SAM est ainsi transformée en SAH. Pfs hydrolyse l'adénine de la SAH pour former la SRH. LuxS agit sur SRH pour produire de la DPD et de l'homocystéine. La DPD se cyclise pour former la pro-AI-2, puis le bore est ajouté pour former l'AI-2. La voie verticale à une étape à partir du SAH montre le mécanisme de détoxification du SAH chez les bactéries, les eucaryotes et les archées ne contenant pas de LuxS. Dans ces organismes, la SAH hydrolase convertit la SAH en adénosine et homocystéine.

Actuellement, le mécanisme de signalisation du QS médié par les molécules AI-2 n'est pas complètement défini chez la plupart des bactéries, comme c'est le cas chez beaucoup de bactéries Gram positif. Il peut également être différent en fonction des bactéries. Par exemple, le mécanisme de signalisation du système LuxS/AI-2 est différent pour *Vibrio harveyi* et *Salmonella spp* (Guo et al., 2013).

D'une part, *V.harveyi* utilise un système senseurs/régulateurs à deux composants avec un senseur membranaire (LuxQ) qui va induire une cascade de déphosphorylation sur LuxU et LuxO (Figure 4). Quand ce dernier est déphosphorylé, il y a production d'une molécule LuxR qui va réguler des gènes spécifiques tels que ceux induisant la bioluminescence.

D'autre part, *Salmonella spp* utilise un système de reconnaissance lié à un ABC transporteur (LsrC, LsrD et LsrA) qui va reconnaître spécifiquement les AI-2 (molécules signales) (Figure 4). Une fois dans le cytoplasme de la bactérie, la molécule signal est phosphorylée par une kinase (LsrK). Cette phosphorylation sert de cofacteur à un régulateur de transcription, LsrR, qui va activer ou réprimer des gènes spécifiques comme des gènes de virulence.

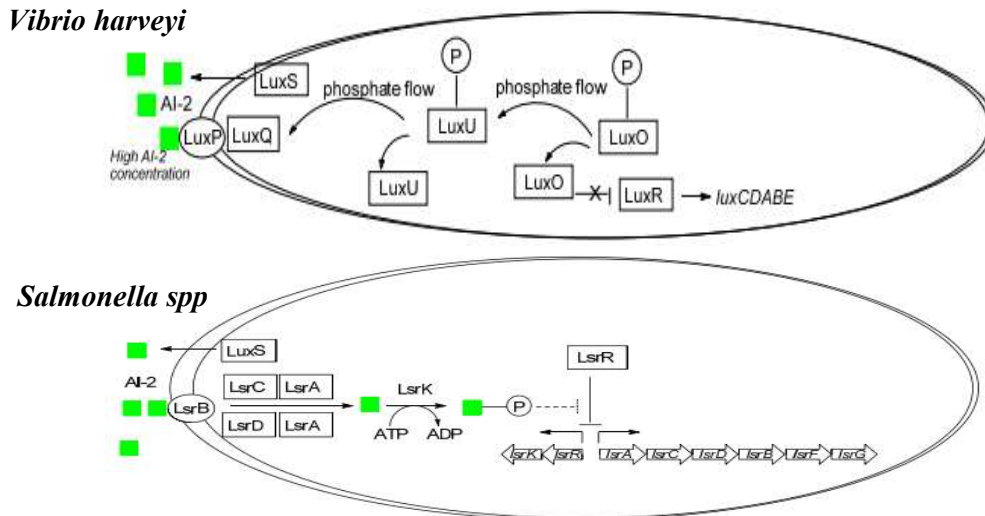


Figure 4 : Représentation de la voie du Quorum Sensing médiée par le système LuxS/AI-2 chez *Vibrio harveyi* et *Salmonella spp.* (Guo et al., 2013).

c) *Le Quorum Sensing chez les Actinobacteria :*

Le phylum des Actinobacteria est l'un des plus grands phyla du domaine Bacteria. Pourtant, l'analyse du QS chez les Actinobacteria est très peu présente dans la littérature. En effet, peu d'analyses expérimentales ont été effectuées sur ce phylum pour étudier le QS. Les quelques études qui ont été effectuées ce sont surtout concentrées sur certaines espèces telles que *Bifidobacterium*, ou encore *Streptomyces* (Sun *et al.*, 2014; Polkade *et al.*, 2016; Xu, 2016).

Le système de communication type QS est différent pour ces deux espèces. En effet, *Bifidobacterium* utilise un système LuxS/AI-2 comme vu précédemment (Sun *et al.*, 2014). Alors que *Streptomyces* utilise un système de QS grâce à des molécules signales appelées GBL (aussi A-factor) chez *Streptomyces griseus* ou encore MMFs chez *Streptomyces coelicolor* (Polkade *et al.*, 2016; Xu, 2016). Ce système est similaire au système AHL présent chez les bactéries Gram positif. En effet, les molécules GBL ou MMFs sont des molécules homologues aux AHL. A une concentration seuil dans le milieu extracellulaire, ces molécules vont diffuser à travers la membrane bactérienne et interagir avec un récepteur intracellulaire (Figure 5) (Polkade *et al.*, 2016). Cette interaction activera l'expression de gènes cibles comme les gènes impliqués dans la production de molécules antibiotiques ou dans la sporulation.

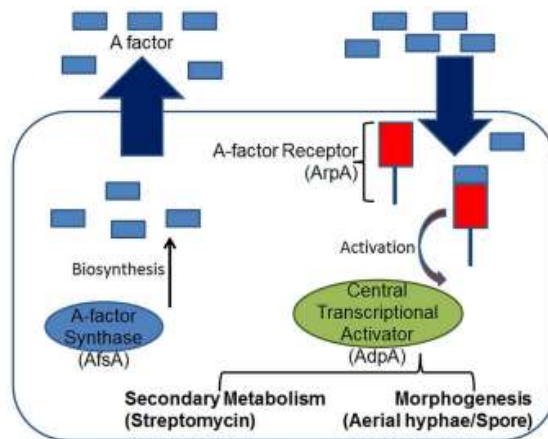


Figure 5 : Mécanisme du Quorum Sensing chez *Streptomyces griseus*. (Polkade et al., 2016) Similaire aux bactéries Gram négatif, à une concentration seuil, les molécules signales (A-factor ou GBL) vont interagir avec un récepteur intracellulaire qui va activer l'expression d'un activateur transcriptionnel AdpA et ainsi réguler des gènes cibles.

d) *Le Quorum Sensing chez les Propionibacteriaceae :*

A l'heure actuelle, le QS dans la famille des *Propionibacteriaceae*, une famille du phylum des Actinobacteria, n'a pas été mis clairement en évidence. Des études ont montré que les espèces *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* et *Acidipropionibacterium acidipropionici* possèdent le gène *luxS* et produisent des molécules de type AI-2 (Romero *et al.*, 2015; Cavero-Olguin *et al.*, 2019). Coenye *et al.*, 2007 ont également mis en évidence la production de molécules de type AI-2 chez l'espèce *Cutibacterium acnes*. La découverte des molécules AI-2 au sein de certaines espèces suggère qu'elles ont la possibilité de réaliser du QS, mais actuellement, il n'a toujours pas été mis en évidence.

3) *Impact des stress sur le Quorum Sensing :*

Les bactéries propioniques laitières peuvent subir différents stress, du fait qu'elles soient utilisées en tant que ferments pour l'affinage des fromages ainsi qu'en tant que probiotiques qui modulent le système immunitaire et le microbiote intestinal. Ces différents stress peuvent être par exemple des stress thermiques, osmotiques ou encore des stress provoqués par des sels biliaries.

Plusieurs études (Moslehi-Jenabian *et al.*, 2009; Yeo *et al.*, 2015; Gu *et al.*, 2018) ont étudiées l'impact de ces différents stress sur le système LuxS/AI-2 du QS. Ces études ont été faites principalement sur des espèces de *Lactobacillus*. Il a alors été montré que pH, les acides biliaries, la température et le stress osmotique modulent l'activité AI-2 des souches testées.

A ce jour, aucune étude similaire n'a été effectuée sur des bactéries propioniques laitières.

4) Objectif de l'étude :

Cette étude vise à déterminer si *Propionibacterium freudenreichii* possède une activité Quorum Sensing. En effet, cette bactérie est particulièrement utilisée en tant que ferment pour l'affinage des fromages à pâte pressée cuite de type Emmental, ainsi qu'en tant que probiotique qui module le système immunitaire et le microbiote intestinale. On peut donc supposer que les bactéries interagissent entre elles, avec les autres bactéries et avec leur environnement. Ces interactions peuvent correspondre à une activité Quorum Sensing.

Ensuite, l'impact des stress causés par la fabrication des fromages ainsi que par le système digestif sur l'activité du Quorum Sensing de *Propionibacterium freudenreichii* mise en évidence sera mesuré.

Matériels et méthodes

1) Conditions de culture de *Propionibacterium freudenreichii*

Lors de cette étude, 2 souches de *Propionibacterium freudenreichii* ont été utilisées : CIRM-BIA 1 et CIRM-BIA 129. Elles sont conservées au laboratoire UMR STLO dans la collection du CIRM-BIA (Centre de Ressources Biologiques pour les Microorganismes - Bactéries d'Intérêt Alimentaire) sous forme de stocks glycérolés à -80 °C.

Des suivis de croissance de ces deux souches, à 30°C, en tubes, sans agitation, ont été effectués soit en milieu YEL (Yeast Extract Lactate) (Malik *et al.*, 1968), soit en milieu PUF (perméat d'ultrafiltrat de lait additionné de peptone de caséine (0,5 %) et de lactate de sodium (1.26 %, soit 50 mM à pH 7)) (Cousin *et al.*, 2012). Ce milieu PUF est obtenu par ultrafiltration du lait sur une membrane avec un seuil de coupure de 8 kDa, permettant ainsi d'obtenir un milieu laitier ne contenant ni les lipides, ni les protéines du lait. Cette séparation est effectuée au sein du STLO sur la plateforme technologique.

2) Dénombrements bactériens :

Les dénombrements bactériens ont été réalisés à chaque temps de la cinétique de croissance (24 h, 48 h, 72 h et 96 h) pour contrôler l'aptitude à former des colonies. Ils ont été effectués par micro-méthode (Baron *et al.*, 2006). Cette méthode consiste à réaliser, dans une plaque de microtitration, des dilutions successives en série au 1/10^{ème} (jusqu'à 10⁻⁷) dans un volume final de 200 µL puis à inoculer, dans des plaques 6 puits, 100 µL des dilutions 10⁻⁵, 10⁻⁶ et 10⁻⁷ dans 3 mL de milieu gélosé YELA (YEL + agar). Les plaques ont ensuite été mises à incuber pendant 5 jours à

30°C en anaérobiose en présence d'un piège à oxygène générateur d'anaérobiose de type ATCO Biocult (Atmosphère Contrôle, Bretteville-sur-Odon, France).

3) Analyse de bioluminescence et spectrométrie de masse :

L'analyse en bioluminescence permet de mettre en évidence une activité biologique de QS de type AI-2 en utilisant une souche reportrice *Vibrio campbelli (harveyi)* BB170. Cette souche reportrice est mutée sur le récepteur LuxN et ne produit de la bioluminescence que lorsqu'elle détecte des AI-2 exogènes. Ainsi, si les surnageants de culture des souches testées contiennent des AI-2, leur addition à une culture de cette souche induit une bioluminescence.

De plus, la spectrométrie de masse a été utilisée pour quantifier, dans les surnageants, la molécule DPD (4,5-Dihydroxy-2,3-pentanedione), précurseur de biosynthèse de la molécule de QS AI-2, borate diester, produite par *P. freudenreichii*.

Pour ces deux analyses, les cultures de *P. freudenreichii* ont été centrifugées 10 minutes à 8000 g et les surnageants ont été récupérés et envoyés pour analyse à Nantes. En effet, les mesures de bioluminescence ont été effectuées à l'UMR SECALIM (INRAE, Nantes), par Lénaïg BRULE et Marie-France PILET, suivant le protocole de Sivakumar et al. (Sivakumar *et al.*, 2011). La spectrométrie de masse a été effectuée au CHU de Nantes par Mickaël CROYAL (CRNH-Ouest Mass Spectrometry Core Facility, Université de Nantes, CHU Nantes, Inserm, CNRS).

4) Extraction d'ADN :

Les extractions ont été réalisées selon le protocole décrit dans Parayre et al. (Parayre *et al.*, 2007). Brièvement, pour chaque culture bactérienne, 1 mL de culture (maximum 2.10^9 bactéries) a été centrifugé à 5000 g pendant 10 min. Le culot a ensuite été repris dans 360 µL de tampon de lyse (1.2% Triton X100, 20 mg/ml lysozyme, 10 µl/ml mutanolysine 5 U/µl) et incubé pendant 1 heure à 37°C. Pour finir de lyser la membrane bactérienne, 50 µL de protéinase K (20 mg/ml, Qiagen, Allemagne) et 400 µL de tampon AL (Réactif du kit Dneasy Tissue kit, Qiagen, Allemagne) ont été ajoutés. Après 30 min d'incubation à 56°C, 400 µL d'éthanol absolu à -20°C a été ajouté puis le tout incubé 5 minutes à température ambiante. Les ADN génomiques ont ensuite été purifiés avec le DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Allemagne) selon le protocole du fournisseur. Les extraits d'ADN ont été dosés par spectrophotométrie à 260 nm à l'aide d'un Nanodrop et conservés à -20°C.

5) Extraction d'ARN :

Pour CIRM-BIA 1 ainsi que CIRM-BIA 129 et à différents temps de culture (24 h, 48 h, 72 h et 96 h), un volume correspondant à une quantité de 5.10^9 UFC/mL a été prélevé. Du RNA protect

reagents (Qiagen, Allemagne) a été ajouté sur les culots pour inactiver les RNases et ainsi protéger et préserver les ARN. Les bactéries ont ensuite été culottées à 8000 g pendant 10 min puis leurs parois ont été fragilisées avec du lysozyme (20 mg/mL dans du TE 1X). Ensuite une lyse mécanique a été effectuée avec une solution contenant des billes zirconium 0,1 mm et du SDS à 10%. Cette lyse a été réalisée avec un broyeur Precellys Evolution (Bertin, France), qui secoue à 6500 rpm pendant 2x40 secondes avec une pause de 30 secondes. Les ARN totaux ont ensuite été extraits avec le kit RNeasy Mini (Qiagen, Allemagne) selon les instructions du kit. Les ARN totaux ainsi extraits ont été traités par une DNase (DNA-free kit, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Etats-Unis) permettant ainsi d'éliminer une éventuelle contamination avec de l'ADN génomique. Les ARN ont été analysés comme décrit ci-dessous.

6) Analyse de qualité des ARN extraits :

Après extraction des ARN, plusieurs validations ont été nécessaires pour pouvoir publier les résultats de PCR quantitative. Ces différentes validations sont notamment expliquées dans le “MIQE Guidelines : Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments” de Bustin et al. (Bustin *et al.*, 2009). Les validations concernant les extraits d'ARN sont représentées de manière simplifiée dans la Figure 6.

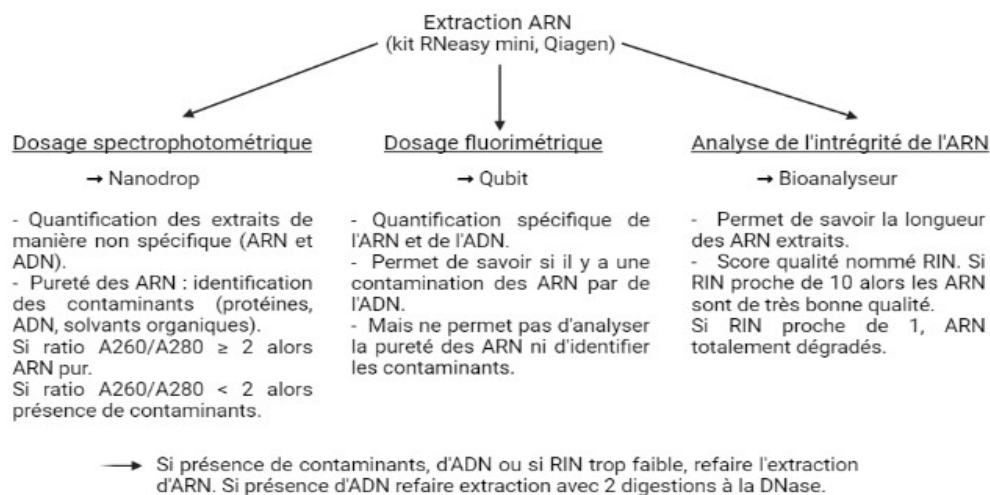


Figure 6 : Les différentes étapes à effectuer pour le contrôle qualité des extraits d'ARN (Bustin *et al.*, 2009).

Tout d'abord, les concentrations en acides nucléiques et leurs pureté (possible contaminations par des protéines ou molécules organiques) ont été déterminés grâce à un Nanodrop par une analyse spectrophotométrique à 260 nm (spécifique des acides nucléiques), 280 nm (spécifique des protéines) et 230 nm (spécifique des molécules organiques). Cependant, cette technique ne permet pas de connaître les concentrations spécifiques d'ARN et d'ADN dans les extraits. Un dosage fluorimétrique

a donc été réalisé à l'aide d'agents intercalants de l'ADN et de l'ARN et du Qubit. Il détermine ainsi le taux de contamination ADN dans les extraits d'ARN.

L'intégrité et la longueur des ARN ribosomiques 23 S (2.9 kb) et 16S (1.5 kb) ont été validées par une analyse électrophorétique capillaire sur une puce (Bioanalyzer Agilent RNA 6000 Nano Kit, Agilent, Etats-Unis) avec un Agilent 2100 Bioanalyzer selon le protocole fourni par le fournisseur pour l'ARN procaryote. Une note sur 10 (RNA Integrity Number) a ainsi été attribuée à chaque extrait par le logiciel Bioanalyzer 2100 Expert (Agilent, Etats-Unis). Seuls les extraits de RIN supérieur ou égal à 7 ont été conservés pour analyse ultérieure.

De plus, l'absence d'ADN génomique a été confirmée par PCR quantitative par tentative d'amplification d'un échantillon d'ARN non rétro-transcrits en mimant les dilutions des extraits utilisées pour la rétro-transcription.

7) Rétro-transcription :

La rétro-transcription consiste à synthétiser de l'ADN complémentaire (ADNc) simple brin à partir de l'ARN. Pour se faire, la transcriptase inverse a plusieurs possibilités. Soit à partir de random primers (Figure 7-A), qui sont un mélange d'hexamères qui s'hybrident sur des brins d'ARN dès qu'ils trouvent des séquences complémentaires. Dans ce cas-là, tous les ARN seront convertis en ADNc. Ou soit à partir d'une amorce spécifique (Figure 7-B).

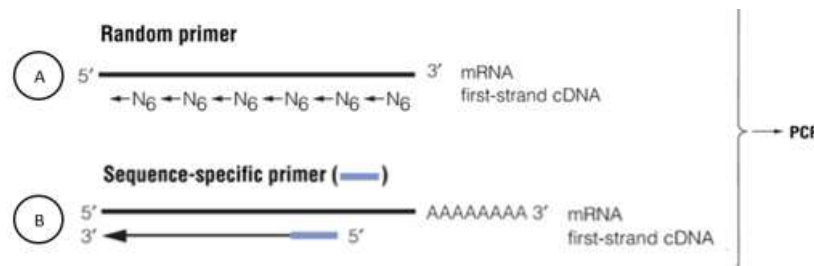


Figure 7 : Différentes stratégies possibles pour convertir les ARN en ADN complémentaire (ADNc). (A) Utilisation de random primers qui sont des mélanges d'hexamères. Ils vont venir s'hybrider sur des séquences complémentaires localisées sur le brin d'ARN. (B) Utilisation d'une amorce spécifique.

Lors de cette étude, la synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) a été réalisée en utilisant le qScript cDNA synthesis kit (Quantabio) ainsi qu'un thermocycleur Veriti (Thermo Fisher). Ce kit contient des random primers et des oligo d(T) (soit la stratégie A dans la Figure 7) permettant ainsi une quantification précise de l'expression des gènes. Pour réaliser cette rétro-transcription, 5 µL contenant 300 ng d'ARN ont été ajoutés à un volume final de 20 µL contenant le qScript reaction mix et la qScript RT (rétro-transcriptase). Puis la rétro-transcription a eu lieu en suivant les conditions suivantes : 22°C pendant 5 minutes, 42°C pendant 30 minutes et 85°C pendant 5 minutes. Les ADNc

obtenus ont été conservés à -80°C et dilués extemporanément au 1/100^{ème} avant amplification par PCR quantitative.

8) PCR quantitative (qPCR) des échantillons :

La qPCR a été effectuée dans un volume final de 16 µL contenant du IQ SYBR Green Supermix 2X (Bio-Rad) (8 µL), les couples d'amorces (3 µL à 300 nM pour les couples d'amorces *groEL2*, *gyrB*, *gtfF*, *eno1*, *sdaA*, *tuf* et *luxS* ou à 600 nM pour les couples d'amorces *ndk*, *cbiM* et *serA*), et 5 µL d'ADN ou d'ADNc. La réaction a été mise en œuvre avec le CFX 96 real-time PCR (Bio-Rad) en commençant par une dénaturation à 95°C pendant 3 minutes. Celle-ci était suivie de 39 cycles comportant chacun : dénaturation à 95°C pendant 15 secondes, hybridation pendant 60 secondes à 60°C et extension à 72°C pendant 1 minute. Une étape de dénaturation de l'amplicon de 0,5°C/min de 65°C à 95°C a été réalisée pour vérifier la spécificité de l'amplification et déterminer la température de fusion de l'amplicon. L'appareil détecte la fluorescence provenant du Sybergreen intercalé dans les doubles brins d'ADN. La fluorescence est proportionnelle à la quantité d'ADN double brin amplifiée, cette quantité étant elle-même proportionnelle à la quantité d'ADN ou d'ADNc déposée avant amplification.

Les résultats de PCR quantitative peuvent être exprimés de deux façons : absolue ou relative.

a) *Analyse quantitative absolue :*

Cette quantification est basée sur l'évaluation de la quantité des transcrits en se basant sur une gamme de standard dont la quantité est connue. Les courbes de standard obtenues avec de l'ADN provenant d'une culture pure ont été utilisées pour déterminer le nombre de copies d'ADNc de chaque gène testé en utilisant le logiciel CFX Manager (Bio-Rad, Etats-Unis). Les gammes de standard ont été réalisées pour les souches CIRM-BIA 1 et CIRM-BIA 129 par dilutions en série (1/10^{ème}) d'ADN génomique dans de l'eau, en commençant par un extrait d'ADN à 2,5 ng/µL. Cinq µL de chaque dilution ont été amplifiés par PCR quantitative comme indiqué ci-dessus. A partir des courbes de fluorescence obtenues, le logiciel CFX Manager a déterminé automatiquement un Ct « cycle threshold ». Il détermine un seuil de fluorescence, qui se situe dans la phase exponentielle d'amplification et renvoie un Ct pour chaque point de la gamme de standard en fonction du croisement entre le seuil et les courbes de fluorescence mesurées à chaque cycle de la PCR quantitative (Figure 8-A).

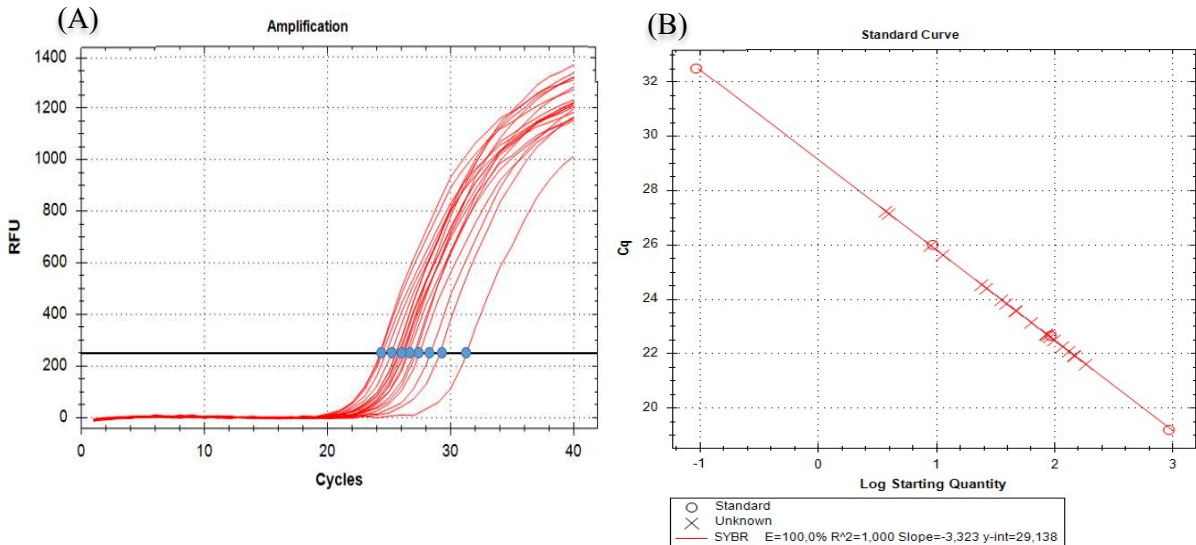


Figure 8 : Analyse des RT-Opqr sur le logiciel CFX Manager (A) Graphique obtenu sur le logiciel CFX Manager après la PCR quantitative. (B) Graphique obtenu après la détermination du Ct, fait par le logiciel CFX Manager. Il fait une représentation du Log de la quantité en fonction du Ct (écrit Cq sur CFX Manager) permettant ainsi de réaliser des courbes de standards.

Pour chaque point de la gamme de standard, on indique dans le logiciel la quantité d'ADN déposée par puit, exprimée en nombre de copies 'équivalent génome'. La courbe de standard affichée (Figure 8-B) correspond à une droite de régression linéaire dont l'équation exprime les valeurs de Ct de la qPCR en fonction du logarithme du nombre de copies d' 'équivalent génome'. Les nombres de copies 'équivalent génome' que l'on retrouve dans la Figure 8-B, ont été calculés à l'aide de la formule suivante : $nombre\ de\ copies\ 'équivalent\ génome' = \frac{quantité\ d'ADN * 6,022.10^{23}}{longueur\ du\ génome * 1.10^9 * 650}$

Par exemple, le point de la gamme d'ADN à 2,5 ng/μL pour les souches CIRM-BIA 1 et CIRM-BIA 129 a un nombre de copies 'équivalent génome' de $9,26.10^2$.

Plusieurs couples d'amorces ont été testés pour chaque culture : *groEL2*, *gyrB*, *gtfF*, *eno1*, *sdaA*, *tuf*, *cbiM*, *ndK*, *serA*, ainsi que le couple d'amorces ciblant le gène d'intérêt *luxS*. Les couples d'amorces possédant une efficacité d'amplification située entre 85 % et 100 % ont été conservés pour la poursuite de mon stage.

b) Analyse quantitative relative :

Cette quantification relative consiste à analyser les variations d'expression d'un gène d'intérêt entre deux conditions en normalisant par l'expression des gènes de référence (également dit 'de ménage') dont l'expression varie très peu. Cette normalisation permet d'éliminer les effets de fluctuations et permet de s'affranchir d'amplifier les gammes de standard après vérification de l'efficacité de l'amplification. La normalisation consiste à diviser le nombre de copie 'équivalent

génomique' du gène à étudier (ici *luxS*) par la moyenne géométrique du nombre de copie 'équivalent génome' de trois gènes de référence d'expression stable choisis parmi *groEL2*, *gyrB*, *gtfF*, *eno1*, *sdaA*, *tuf*, *cbiM*, *ndk*, *serA*. Pour cela, les ARNm des gènes de référence doivent être exprimés de manière stable, et leur abondance doit présenter une forte corrélation avec les quantités totales d'ARNm présentes dans les échantillons. La normalisation par rapport à un seul gène de référence n'est pas acceptable, sauf si les chercheurs présentent des preuves claires qui confirment son expression invariable dans les conditions expérimentales décrites. Le nombre optimal et le choix des gènes de référence doivent être déterminés expérimentalement et la méthode rapportée (Vandesompele *et al.*, 2002; Andersen *et al.*, 2004).

Lors de cette étude, les résultats de qPCR obtenus ont été analysés en quantification relative. Et le nombre optimal de gène de référence utilisé étaient de 3 et différents gènes de référence d'expression stable ont été choisis selon les expérimentations (cinétique ou stress).

Chaque échantillon a été analysé en triplicata. L'absence d'ADN dans les extraits d'ARN a été vérifiée en réalisant un témoin d'ARN non rétro-transcrits. Ces derniers doivent avoir une valeur de Ct très grande et au moins 5 Ct d'écart avec les Ct des ADNc pour éviter une surévaluation de l'expression du gène d'intérêt.

9) Challenge aux stress :

Le challenge au stress consiste à tester, sur une souche de *P. freudenreichii*, différents stress (acide, salins et sels biliaires) représentant ainsi les stress que l'on peut retrouver lors de la fabrication de fromage ou lors de la digestion. Après application des différents stress, le niveau d'expression du gène *luxS* a été étudié par RT-qPCR, ainsi que l'activité QS de type AI-2 et la présence de DPD par bioluminescence et par spectrométrie de masse, respectivement.

Pour cela, une culture de *P. freudenreichii* CIRM-BIA 1 a été incubée à 30°C dans du milieu PUF. Lorsque la DO_{650 nm} a atteint 0,5 (phase exponentielle de croissance), la culture a été centrifugée à 8000 g pendant 10 minutes. Les bactéries ont été resuspendues dans du milieu stérile suivant plusieurs conditions. Du milieu PUF frais a servi de milieu contrôle sans stress. Du milieu PUF additionné de sels biliaires (cholate + déoxycholate) à 0,2 g/L comme décrit précédemment (Leverrier *et al.*, 2003). Du milieu PUF additionné de 0,3 M de NaCl pour un stress osmotique comme décrit précédemment (Gaucher *et al.*, 2019). Du milieu PUF acidifié à pH 4,9 comme décrit précédemment (Jan *et al.*, 2001b). Elles ont ensuite été incubées à 30 °C pendant 4 heures.

Toutes ces conditions sont réalisées en triplicata.

Pour l'analyse de l'expression du gène *luxS* en fonction des différents stress appliqués, une mesure de la densité optique à 650 nm et une numération en micro-méthode ont été effectuées après les 4 heures d'incubation afin de connaître le volume de culture à prélever pour une extraction d'ARN optimale (équivalent à 5.10^9 UFC/mL). En fonction de cela, 2 volumes de RNA protect ont été ajoutés sur 1 volume de culture. Une centrifugation pendant 10 minutes à 8000g a été effectuée puis les culots bactériens ont été congelés à -80°C . Ensuite une extraction d'ARN a été effectuée dans le but d'une analyse transcriptomique comme décrit ci-dessus.

Suite à l'application des stress, l'analyse du QS par bioluminescence et par spectrométrie de masse a été réalisée comme décrit ci-dessus.

10) Analyse statistique :

Les résultats ont été analysés avec le logiciel de statistiques R Studio, en utilisant des tests de comparaison de moyennes par Anova avec le test de Tukey (post-hoc HSD). Le seuil de significativité est de 0,05 (*, $P < 0,05$) pour déterminer les différences significatives entre les échantillons. Sur certains graphes, il y a également des seuils de significativité de 0,001 et de 0,0001 (**, $P < 0,001$ et ***, $P < 0,0001$).

Résultats et Discussion

1) Courbes de croissance de *Propionibacterium freudenreichii* :

Dans un premier temps, des suivis de croissance de *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA 1 et CIRM-BIA 129 ont été réalisés en milieu PUF pendant 96 h (Figure 9) par mesure de la DO, ainsi que par suivi du pH, au cours du temps. Les cinétiques de croissance de ces deux souches de *P. freudenreichii* montrent que la souche CIRM-BIA 129 atteint la phase stationnaire de croissance en 40 heures. Et que la souche CIRM-BIA 1 l'atteint en 50 heures de croissance. Le temps de génération de la population bactérienne est de 6,7 heures et de 7,5 heures pour ces deux souches, respectivement.

Les données obtenues correspondent à celles observées dans la littérature (Cousin *et al.*, 2012) annonçant des temps de génération entre 5 et 8 heures pour *P. freudenreichii*.

De plus, sur la Figure 9, une acidification au cours de la croissance est observée, avec une légère phase de latence pendant laquelle le pH reste proche de 6,8 durant 15 heures puis une diminution du pH jusqu'à 5,14. Cette phase de latence s'explique par le fait que *P. freudenreichii* va

au départ métaboliser un acide organique, le lactate, présent dans le milieu PUF. Le lactate sera alors métabolisé en succinate puis en propionate *via* le pyruvate grâce la voie de Wood-Werkman (Deborde and Boyaval, 2000). La transformation d'un acide en un autre acide va donc conduire à une faible acidification du milieu. Ensuite, une fois le lactate épuisé dans le milieu, *P. freudenreichii* va métaboliser le lactose présent dans le milieu. La consommation du lactose va venir acidifier le milieu du fait de la transformation d'un sucre (lactose) en acides (acetate et propionate).

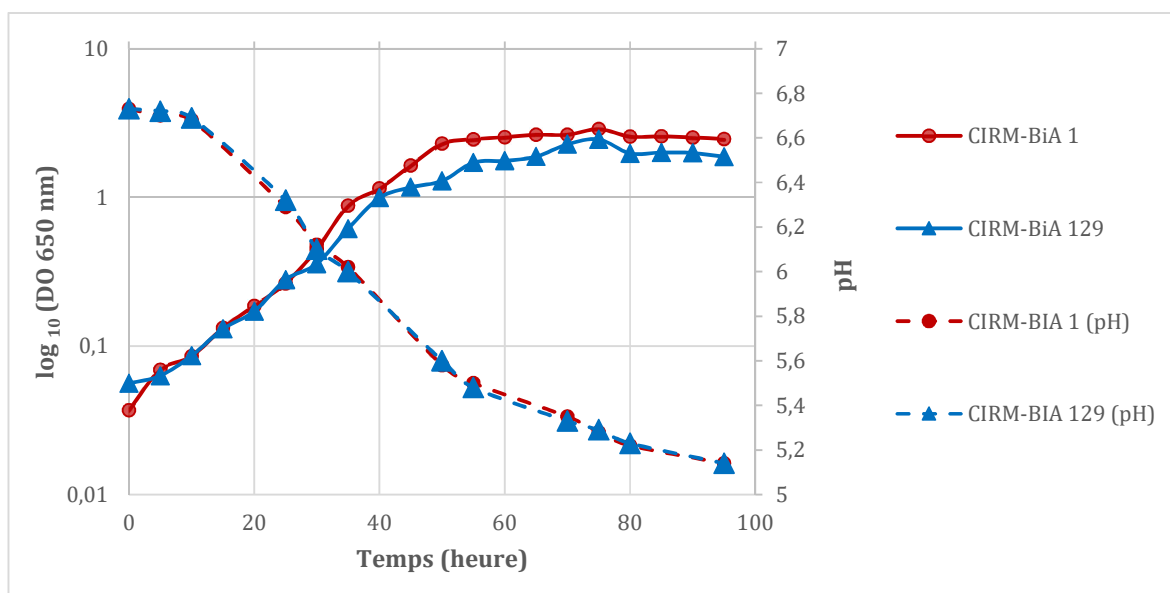


Figure 9 : Cinétiques de croissance et courbes de suivi de pH de la souche *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA 1 et CIRM-BIA 129. Suivi de croissance par mesure de la DO à 650 nm, ainsi que du pH. Les marqueurs ronds représentent la souche *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA 1 et les marqueurs triangulaires pour la souche CIRM-BIA 129. Les traits pleins correspondent au suivi de croissance et les traits pointillés au suivi de pH. Ces cinétiques ont été suivies jusqu'à 96 h de culture.

2) Etude des efficacités des couples d'amorces :

Pour pouvoir étudier le niveau d'expression d'un gène en RT-qPCR, il est nécessaire d'avoir des gènes de référence qui vont servir pour la normalisation. Pour cela, une détermination des efficacités d'amplification de plusieurs couples d'amorces a été réalisée pour les deux souches CIRM-BIA 1 et CIRM-BIA 129 (Tableau 1). Pour avoir une bonne amplification de PCR, il faut que les couples d'amorces aient une efficacité entre 85% et 100%. Pour certains couples d'amorces, il a donc fallu augmenter la concentration d'amorces pour avoir une bonne efficacité. Ça a été le cas pour les couples d'amorces *cbiM*, *ndk* et *serA*. Ces efficacités ont été calculées à l'aide du logiciel CFX Manager après une PCR quantitative.

Tableau 1 : Tableaux résumant les couples d'amorces testés avec les séquences forward et reverse, la concentration utilisée ainsi que l'efficacité d'amplification obtenue par PCR quantitative, pour la souche *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA 1 (A) et CIRM-BIA 129 (B).

(A)

Gène	Nom amorce F	Nom amorce R	Séquence forward	Séquence reverse	Concentration amorce R/F(nM)	Efficacité (%)
<i>lux S1</i>	lux S-cirm1- F1	luxS-cirm1-R1	ACCCAGCACATGAACGTCTGA	GGTTCACATTCGGCTGGCAG	300	116,3
	lux S-cirm1- F1	luxS-cirm1-R1				105,5
<i>gyrB</i>	gyrB F1	gyrB R1	TTGCAGGGCAGCGACCACTT	GACCAGCGCACGGCAACAT	300	92
	gyrB F1	gyrB R1				87,9
<i>gtfF</i>	gtfF F1	gtfF R1	TGGTGACGCCGAAGGACTC	GCAGCACGAGCAGGAACAC	300	95,2
	gtfF F1	gtfF R1				87
<i>eno1</i>	eno F1	eno R1	TACGAGTTCGAGGGCAAGTC	AAACCAGCGGGTAGTCATTG	300	95,9
	eno F1	eno R1				99,9
<i>sdaA</i>	sdaA F1	sdaA R1	CGCGGAACTGCTCAATATCT	CACCTCGTCCTTCGAGTAGC	300	89,8
	sdaA F1	sdaA R1				92,6
<i>groEL2</i>	groEL2-Pfg2-F	groEL2-Pfg2-R	CAATGTCGTGTTGGAGAAG	CGCCGATCTTGTGGTAGG	300	98,1
	groEL2-Pfg2-F	groEL2-Pfg2-R				95,7
<i>cbiM</i>	cbiM F	cbiM R	CGCCTATGTGCTCAACAAGA	GTCACGCAGTAGGTGGACAG	600	103,5
	cbiM F	cbiM R				90,1
<i>ndK</i>	ndK F	ndK R	GTCATGTGGATGCCGACT	GGCCACAGGTGATGAATG	600	86,5
	ndK F	ndK R				82,3
<i>serA</i>	serA F	serA R	GCCAGTTGTCGAGATGA	GCACGGAACGGTTGTAGG	600	84,7
	serA F	serA R				85,3

(B)

Gène	Nom amorce F	Nom amorce R	Séquence forward	Séquence reverse	Concentration amorce R/F(nM)	Efficacité (%)
<i>lux S1</i>	lux S-cirm1- F1	luxS-cirm1-R1	ACCCAGCACATGAACGTCTGA	GGTTCACATTCGGCTGGCAG	300	107,9
	lux S-cirm1- F1	luxS-cirm1-R1				101
<i>gyrB</i>	gyrB1 F1	gyrB1 R1	TTGCAGGGCAGCGACCACTT	GACCAGCGCACGGCAACAT	300	91,9
	gyrB1 F1	gyrB1 R1				86,9
<i>gtfF</i>	gtfF F1	gtfF R1	TGGTGACGCCGAAGGACTC	GCAGCACGAGCAGGAACAC	300	88,1
	gtfF F1	gtfF R1				86,1
<i>eno1</i>	eno F1	eno R1	TACGAGTTCGAGGGCAAGTC	AAACCAGCGGGTAGTCATTG	300	95,8
	eno F1	eno R1				85
<i>sdaA</i>	sdaA F1	sdaA R1	CGCGGAACTGCTCAATATCT	CACCTCGTCCTTCGAGTAGC	300	84,4
	sdaA F1	sdaA R1				87,6
<i>groEL2</i>	groEL2-Pfg2-F	groEL2-Pfg2-R	CAATGTCGTGTTGGAGAAG	CGCCGATCTTGTGGTAGG	300	92,2
	groEL2-Pfg2-F	groEL2-Pfg2-R				86,3
<i>cbiM</i>	cbiM F	cbiM R	CGCCTATGTGCTCAACAAGA	GTCACGCAGTAGGTGGACAG	600	100,1
	cbiM F	cbiM R				90,1
<i>ndK</i>	ndK F	ndK R	GTCATGTGGATGCCGACT	GGCCACAGGTGATGAATG	600	82,8
	ndK F	ndK R				82,7
<i>serA</i>	serA F	serA R	GCCAGTTGTCGAGATGA	GCACGGAACGGTTGTAGG	600	88,1
	serA F	serA R				94,1

Pour la suite de l'étude, certains couples d'amorces ont dû être rejetés. Par exemple, ont été rejetés : le couple d'amorces *ndk* qui a une efficacité d'amplification trop faible malgré l'augmentation de la concentration en amorces, ou encore *groEL2* qui est un gène qui n'a pas une expression stable du fait de son implication dans la réponse au stress (Farrar *et al.*, 2000).

3) Expression du gène lux S au cours du temps :

Tableau 2 : Tableau résumant la quantité, la pureté, l'intégrité des ARN extraits à différents temps de croissance (24 h, 48 h, 72 h et 96 h) des souches CIRM-BIA 1 et CIRM-BIA 129, ainsi que le taux de contamination par de l'ADN pour chaque extraits. (A) Tableau récapitulatif des résultats pour le réplica 1. (B) Tableau récapitulatif des résultats pour le réplica 2. (C) Tableau récapitulatif des résultats pour le réplica 3.

(A)

Souche	Temps (h)	Nanodrop				Bioanalyzeur	Qubit			
		ng/μl	A260	A280	260/280	260/230	RIN	ARN (ng/μL)	ADN (ng/μL)	Rapport ADN/ADN+ARN (%)
CIRM-BIA 1	24	448,46	11,212	5,951	1,88	2,01	9,5	392	38,8	9,01
CIRM-BIA 1	48	442,65	11,066	6,052	1,83	1,85	9,9	332	34,6	9,44
CIRM-BIA 1	72	252,15	6,304	3,667	1,72	1,91	10	114	10,8	8,65
CIRM-BIA 1	96	100,58	2,515	1,385	1,81	1,78	10	35,9	5,15	12,55
CIRM-BIA 129	24	194,91	4,873	2,541	1,92	1,76	9,8	142	8,55	5,68
CIRM-BIA 129	48	397,67	9,942	5,195	1,91	1,98	9,9	346	30,7	8,15
CIRM-BIA 129	72	194,53	4,863	2,688	1,81	1,88	10	114	7,8	6,40
CIRM-BIA 129	96	158,51	3,963	2,014	1,97	1,64	10	136	6,3	4,43

(B)

Souche	Temps (h)	Nanodrop				Bioanalyzeur	Qubit			
		ng/μl	A260	A280	260/280	260/230	RIN	ARN (ng/μL)	ADN (ng/μL)	Rapport ADN/ADN+ARN (%)
CIRM-BIA 1	24	56,45	1,411	0,737	1,92	1,5	9,3	26,3	1,61	5,77
CIRM-BIA 1	48	260,41	6,51	3,651	1,78	1,87	10	124	9,95	7,43
CIRM-BIA 1	72	106,52	2,663	1,525	1,75	1,44	10	27,1	5,45	16,74
CIRM-BIA 1	96	260,32	6,508	3,453	1,88	1,9	9,9	183	22,8	11,08
CIRM-BIA 129	24	123,04	3,076	1,556	1,98	1,72	9,3	62	4,36	6,57
CIRM-BIA 129	48	309,91	7,748	4,137	1,87	1,95	10	236	16,8	6,65
CIRM-BIA 129	72	167,57	4,189	2,195	1,91	1,93	10	71,5	6,5	8,33
CIRM-BIA 129	96	153,33	3,833	2,052	1,87	1,97	9,8	120	15,2	11,2

(C)

Souche	Temps (h)	Nanodrop				Bioanalyzeur	Qubit			
		ng/μl	A260	A280	260/280	260/230	RIN	ARN (ng/μL)	ADN (ng/μL)	Rapport ADN/ADN+ARN (%)
CIRM-BIA 1	24	1276,6	31,9	15,5	2,1	2,2	8,3	1460	65	4,3
CIRM-BIA 1	48	603,0	15,1	7,8	1,9	2,1	7,6	520	41	7,3
CIRM-BIA 1	72	249,1	6,2	3,6	1,7	2,3	7,2	130	10,1	7,2
CIRM-BIA 1	96	250,91	6,273	3,427	1,83	2,03	9,8	155	19	10,92
CIRM-BIA 129	24	553,72	13,843	6,94	1,99	2,13	10	520	60	10,34
CIRM-BIA 129	48	746,4	18,7	9,5	2,0	1,7	7,4	650	78,5	10,8
CIRM-BIA 129	72	237,68	5,942	3,109	1,91	1,98	9,9	212	26,6	11,15
CIRM-BIA 129	96	211,5	5,3	2,9	1,8	2,2	7,6	304	10	3,2

Avant d'étudier l'expression du gène *luxS* au cours du temps pour la souche CIRM-BIA 1 et CIRM-BIA 129, un contrôle qualité des ARN extraits a été effectué. Les tableaux (A), (B) et (C) du Tableau 2 récapitulent les quantités, la pureté et l'intégrité des ARN extraits ainsi que le taux de contamination en ADN pour chaque extrait et pour chaque réplica effectué. Entre les trois réplicas, une très grande disparité est observée, que ce soit pour la quantité en acides nucléiques (ARN et ADN) ou encore l'intégrité des ARN. Cela peut être dû à des cellules mortes dans lesquelles les ARN

ribosomiques sont toujours intacts et présents. Le rendement des extractions n'est pas répétable, malgré une normalisation à 5.10^9 UFC/mL au préalable.

Malgré la grande disparité entre les répliques, il y a une bonne intégrité des ARN extraits avec des RIN supérieurs à 7 au Bioanalyzeur (Tableau 2). De plus, la pureté des ARN extraits est correcte. En effet, l'appareil Nanodrop va mesurer les rapports DO_{260nm}/DO_{280nm} et DO_{260nm}/DO_{230nm} pour chaque extrait, permettant ainsi de savoir si l'ARN est contaminé respectivement par des protéines ou des composés cycliques. Plus les rapports sont proches de 2, plus la pureté des ARN est bonne. Ce qui est le cas ici. Un faible taux de contamination en ADN dans les extraits d'ARN est également observé. Il est proche ou inférieur à 10%, ce qui est acceptable.

Les ARN extraits possédaient une qualité et une quantité acceptable qui a permis la poursuite de l'analyse transcriptomiques en RT-qPCR.

Des RT-qPCR ont donc été effectuées pour pouvoir étudier le niveau d'expression du gène *luxS* au cours du temps. Les RT-qPCR ont été analysées en quantification relative. Les gènes de référence choisis pour cette normalisation sont les gènes *sdaA*, *serA* et *gyrB* car ce sont les gènes qui ont l'expression la plus stable lors de cette analyse.

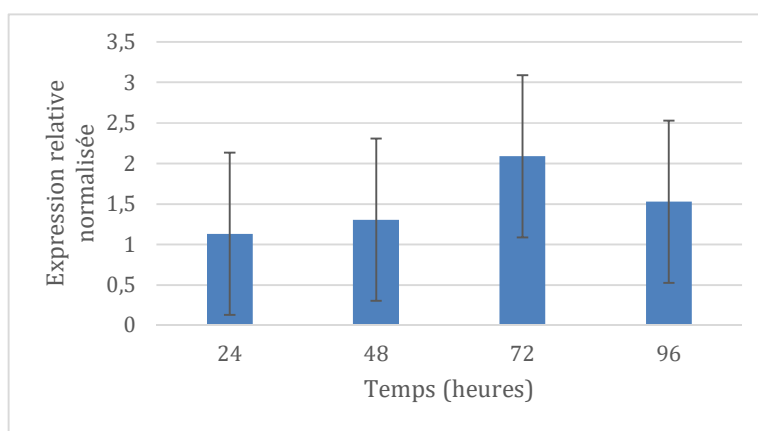


Figure 10 : Niveau d'expression du gène *luxS* de la souche *P. freudenreichii* CIRM-BIA 1 au cours du temps. Cette analyse est obtenue par RT-qPCR. Les gènes de référence utilisés pour la normalisation sont les gènes *sdaA*, *serA* et *gyrB*. Une Anova avec un test de Tukey a été effectuée avec un seuil de significativité à 0,05 (*, $P < 0,05$).

Pour la souche *P. freudenreichii* CIRM-BIA 1, le gène *luxS* est exprimé à tous les temps de croissance étudiés, et ce dès 24 h de culture. De plus, son expression a une tendance à augmenter au cours du temps, jusqu'à 72 h, puis à diminuer à 96 h de croissance (Figure 10). Cependant, ces observations ne sont pas significatives (p-value supérieure à 0,05). Avec ces observations, on peut donc conclure à une expression constitutive du gène *luxS* chez la souche CIRM-BIA 1.

Pour la souche CIRM-BIA 129, les mêmes gènes de normalisation que pour la souche CIRM-BIA 1 ont été utilisés. Pour cette souche, l'expression du gène *luxS* augmente significativement à 96 h de croissance, comparé à 24 h, 48 h et 72 h de culture (p-value inférieure à 0,05) (Figure 11). L'induction du gène *luxS* dépend donc de la phase de croissance chez CIRM-BIA 129.

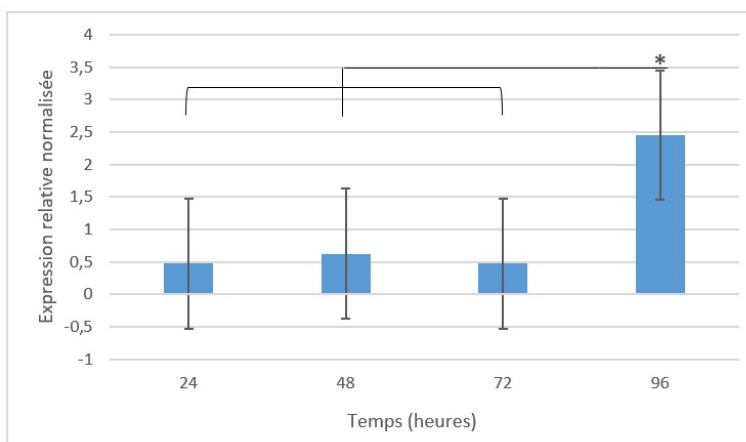


Figure 11 : Niveau d'expression du gène *luxS* de la souche *P. freudenreichii* CIRM-BIA 129 au cours du temps. Cette analyse est obtenue par RT-qPCR. Les gènes de référence utilisés pour la normalisation sont les gènes *sdaA*, *serA* et *gyrB*. Une Anova avec un test de Tukey a été effectuée avec un seuil de significativité à 0,05 (*, $P < 0,05$).

On peut émettre l'hypothèse que la régulation de l'expression du gène *luxS* est dépendante de la souche. Le gène *luxS* semble s'exprimer constitutivement comme le montre également l'étude de Lupp and Ruby, réalisée en 2004. Chez certaines souches comme chez la CIRM-BIA 129, le niveau d'expression de ce gène augmente significativement en fin de phase stationnaire. Ce phénomène n'est cependant pas retrouvé dans la littérature.

4) Analyse de bioluminescence et spectrométrie de masse :

Au sein de cette étude, l'analyse en bioluminescence consiste à savoir, si l'activité QS de type AI-2 est présente chez *P. freudenreichii*. En effet, cette analyse a permis de mettre en évidence la présence d'AI-2 chez CIRM-BIA 1 et CIRM-BIA 129 au cours du temps, en utilisant la souche reportrice *Vibrio campbelli (harveyi)* BB170.

Sur la Figure 12, une augmentation de la bioluminescence au cours du temps est observée. Comme la bioluminescence est induite quand la souche reportrice *Vibrio campbelli (harveyi)* BB170 détecte des molécules AI-2, cela signifie donc que les molécules AI-2 augmentent de manière significative au cours de la croissance des bactéries. En effet, que ce soit pour la souche CIRM-BIA 1 ou pour CIRM-BIA 129, on observe qu'à 24 heures la détection de bioluminescence est faible mais elle augmente de manière significative ensuite. Il y a donc une accumulation des molécules AI-2 dans le

milieu extracellulaire au cours du temps. Donc les souches CIRM-BIA 1 et 129 possèdent une activité QS.

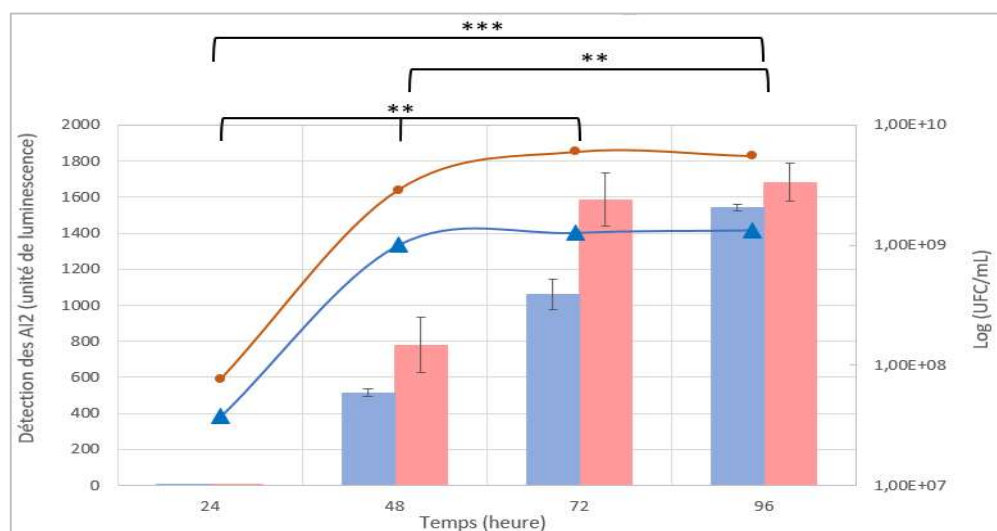


Figure 12 : Détection des molécules AI-2 par bioluminescence et courbe de croissance en UFC/mL sur 96 heures de culture. La détection des molécules AI-2 au cours du temps en représentée pour chaque souche en fonction du temps de croissance post inoculation. En rouge pour la souche CIRM-BIA 1 et en bleu pour la souche CIRM-BIA 129. Les courbes de croissance en fonction de la numération (UFC/mL) sont également représentées. Les marqueurs ronds pour la souche CIRM-BIA 1 et les marqueurs triangles pour la souche CIRM-BIA 129. Une Anova avec un test de Tukey a été effectuée avec un seuil de significativité à 0,05 (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,001$; ***, $P < 0,0001$).

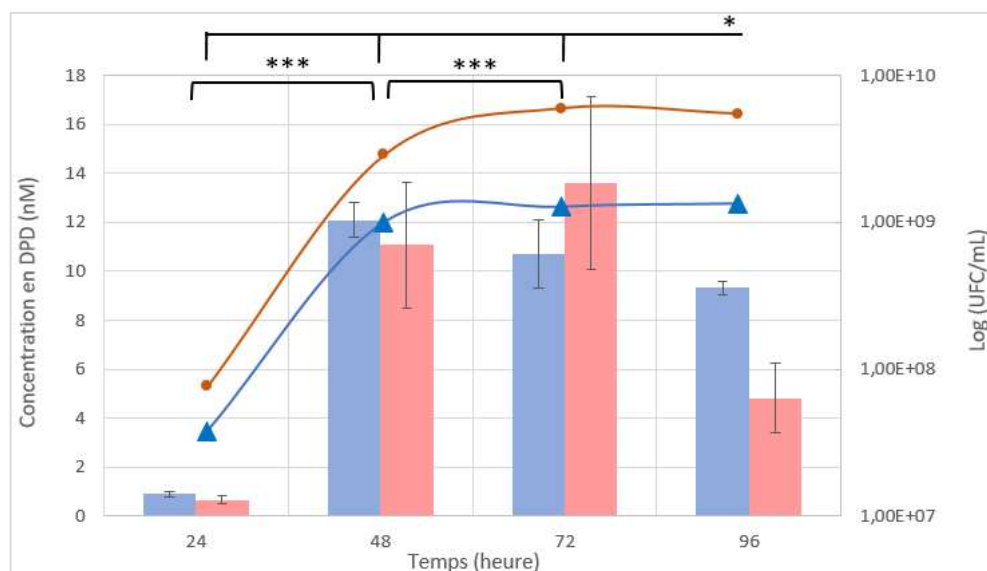


Figure 13 : Concentration du DPD (4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione), précurseur des molécules AI-2, et courbe de croissance en UFC/mL sur 96 heures de culture. La concentration en DPD au cours du temps en représentée sous forme d'histogramme et a été obtenue par spectrométrie de masse. En rouge pour la souche CIRM-BIA 1 et en bleu pour la souche CIRM-BIA 129. Les courbes de croissance en fonction de la numération (UFC/mL) sont également représentées. Les marqueurs ronds pour la souche CIRM-BIA 1 et les marqueurs triangles pour la souche CIRM-BIA 129. Une Anova avec un test de Tukey a été effectuée avec un seuil de significativité à 0,05 (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,001$; ***, $P < 0,0001$).

Une analyse par spectrométrie de masse a été également réalisée. La concentration en DPD, précurseur des molécules AI-2, a été dosée dans le surnageant des milieux de culture au cours du temps. Sur la Figure 13, on remarque que la DPD a augmenté de manière significative entre le temps 24 heures à 48 heures pour les deux souches de *P. freudenreichii* testées. Une différence significative entre les temps 48 heures et 72 heures pour les deux souches a été également observée. Entre ces deux temps, il y avait une diminution de la concentration en DPD pour la souche CIRM-BIA 129 et, *a contrario*, une augmentation de la concentration en DPD pour la souche CIRM-BIA1. Ensuite, après 96 heures de culture, pour les deux souches, on observe une diminution significative de la concentration en DPD.

On peut supposer que la concentration en DPD évolue en fonction de la croissance bactérienne (UFC/mL). En effet, la concentration en DPD augmente jusqu'à la fin de la phase exponentielle de croissance et elle diminue en phase stationnaire de croissance (Figure 13). La diminution de la concentration en DPD en phase stationnaire semble cohérente du fait qu'en phase stationnaire, il y a un épuisement du milieu de culture et une accumulation de déchets qui vont provoquer un ralentissement transcriptomique chez les bactéries pour leur permettre de résister aux dommages.

Comme on le sait, le DPD est générée par l'enzyme LuxS (codée par le gène *luxS*) qui va se transformer, par cyclisation spontanée, en molécules AI-2. En rapprochant les Figures 12 et 13, on peut remarquer que l'accumulation de DPD va permettre une forte production de molécules AI-2 qui vont s'accumuler dans le milieu extracellulaire. On remarque une augmentation des molécules AI-2 en fin de croissance bactérienne alors que la concentration en DPD diminue. Cette augmentation est sûrement dû au fait que la DPD se transforme spontanément en molécule AI-2 active, d'où également la diminution de la concentration en DPD en fin de croissance bactérienne comme les bactéries sont transcriptionnellement moins actives.

Cependant, avec ces résultats on ne sait pas si la détection des molécules AI-2 va diminuer ou stagner ou encore continuer à augmenter au cours du temps. Pour pouvoir répondre à cela, il faudrait prolonger les analyses sur un temps de croissance plus long tel que 168 heures au lieu de 96 heures.

5) Challenge aux stress :

Avant d'étudier l'expression du gène *luxS* en fonction de différents stress appliqués sur la souche CIMR-BIA 1, un contrôle qualité des ARN extraits a été effectué. Le Tableau 3 récapitule les

quantités, la pureté et l'intégrité des ARN extraits ainsi que le taux de contamination en ADN pour chaque extrait et pour chaque réplica effectué.

On observe qu'entre les trois réplicas de chaque milieu « stressant », la quantité, la pureté et l'intégrité des ARN sont répétables et corrects. Les rapports DO_{260nm}/DO_{280nm} et DO_{260nm}/DO_{230nm} obtenus au Nanodrop étaient proches de 2 et les RIN obtenus par Bioanalyseur étaient supérieurs à 7. Sauf pour un réplica du milieu contrôle PUF : le PUF 3. En effet, une erreur lors de l'extraction des ARN a dû se produire puisqu'aucun acide nucléique n'est présent. Cet échantillon a donc été retiré de l'analyse transcriptomique en RT-qPCR.

Tableau 3 : Tableau résumant la quantité, la pureté, l'intégrité des ARN extraits des souches CIRM-BIA 1 et CIRM-BIA 129 après application de différents stress, ainsi que le taux de contamination par de l'ADN pour chaque extrait. PUF 1, 2 et 3 correspondent au milieu PUF contrôle sans stress. SB 1, 2 et 3 correspondent au milieu PUF additionné de 0,2 g/L de sels biliaries, soit un stress salin. NaCl 1, 2 et 3 correspondent au milieu PUF additionné de 0,3 M de NaCl, soit un stress osmotique. Et le pH 1, 2 et 3 correspondent au milieu PUF avec un pH à 4,9 au lieu de 7, soit un stress acide.

Sample ID	Nanodrop				Bioanalyseur	Qubit			
	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230	RIN	ARN (ng/μL)	ADN(ng/μL)	Rapport ADN/ADN+ARN (%)
PUF 1	1108,71	27,718	13,662	2,03	2,08	8,3	870	115	11,7
PUF 2	1163,47	29,087	14,466	2,01	2,26	8,1	840	57	6,4
PUF 3	0,8	0,02	0	-63,59	0,08		0	0	
SB 1	1024,89	25,622	12,838	2	2,26	8	690	60,5	8,1
SB 2	955,23	23,881	12,104	1,97	2,18	8	590	59,2	9,1
SB 3	875,41	21,885	11,05	1,98	2,04	7,9	560	92	14,1
NaCl 1	1607,66	40,191	19,811	2,03	2,28	7,4	1000	187	15,8
NaCl 2	1637,16	40,929	20,161	2,03	2,28	7,1	880	181	17,1
NaCl 3	1482,38	37,059	18,388	2,02	2,18	7,2	930	171	15,5
pH 1	1555,3	38,883	19,294	2,02	2,24	7,6	920	171	15,7
pH 2	1195,39	29,885	14,834	2,01	2,14	7,7	750	137	15,4
pH 3	1426,35	35,659	17,698	2,01	2,24	7,9	810	142	14,9

Des RT-qPCR ont été effectuées pour étudier le niveau d'expression du gène *luxS* en fonction de différents stress appliqués. Les RT-qPCR obtenues ont été analysées en quantification relative. Les gènes de référence choisis pour cette normalisation étaient les gènes *gffF*, *gyrB* et *serA* car ce sont ceux qui avaient l'expression la plus stable lors de cette étude.

A la lecture de l'histogramme obtenu (Figure 14), on observe que les stress appliqués ont une tendance à augmenter l'expression relative du gène *luxS* chez CIRM-BIA 1. Effectivement, que ce soit le milieu PUF additionné avec 0,3 M de NaCl ou avec 0,2 g/L de sels biliaries ou encore avec un pH à 4,9, une augmentation de l'expression relative du gène *luxS* est observée en prenant le milieu

contrôle PUF comme témoin. Cependant, les différences observées entre le milieu contrôle PUF et les milieux « stressants » ne sont pas significatives.

Donc les milieux stressants n'ont pas d'impact significatif sur la régulation de l'expression du gène *luxS*.

Ces résultats ne suivent pas ceux obtenus dans la littérature. En effet, chez *Lactobacillus fermentum*, les stress osmotiques, acides et le stress thermique modulent le niveau d'expression des ARNm du gène *luxS* (Gu *et al.*, 2018). Le fait de ne pas obtenir ces mêmes observations avec l'espèce *Propionibacterium freudenreichii* est peut-être due à des conditions de stress pas assez élevées ou qui n'ont pas duré assez longtemps.

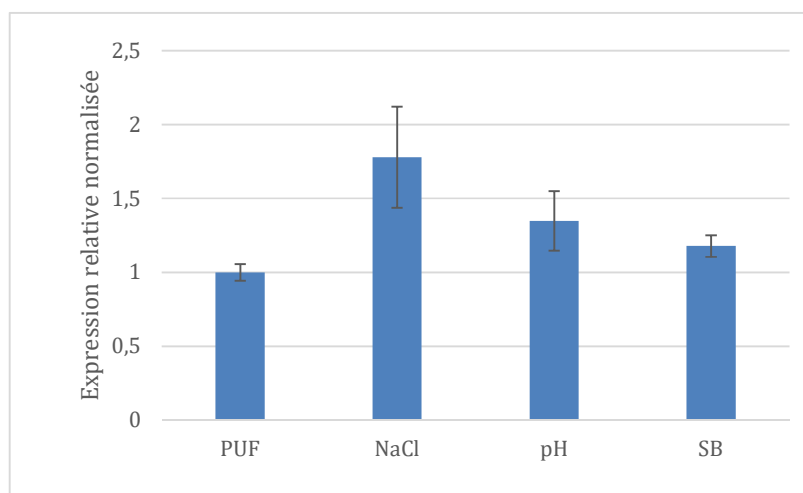


Figure 14 : Niveau d'expression du gène *luxS* de la souche *P. freudenreichii* CIRM-BIA 1 après 4 heures d'incubation dans différents milieux « stressant » (osmotique – 0,3 M NaCl, salin – 0,2 g/L SB et acide – pH 4,9) ainsi que dans milieu contrôle PUF. Cette analyse a été obtenue par RT-qPCR. Les gènes de référence utilisés sont les gènes *gtfF*, *gyrB* et *serA*. Le PUF était le contrôle, il correspond au surnageant de la culture à DO_{650nm} 0,5 après 4 heures d'incubation dans du milieu PUF stérile sans stress. Le NaCl est la culture à DO_{650nm} 0,5 remise en suspension du milieu PUF additionné de 0,3 M de NaCl. Le SB est la culture à DO_{650nm} 0,5 remise en suspension du milieu PUF additionné de 0,2 g/L de sels biliars. Le pH 4,9 est la culture à DO_{650nm} 0,5 remise en suspension du milieu PUF à pH 4,9. Une Anova avec un test de Tukey a été effectuée avec un seuil de significativité à 0,05 (*, $P < 0,05$).

Une mesure de bioluminescence pour détecter les molécules AI-2 a également été effectuée sur les surnageants des cultures de CIRM-BIA 1 après 4 heures d'incubation dans le milieu contrôle PUF et dans les différents milieux « stressants » (Figure 15). On remarque alors que seul le milieu « stressant » avec 0,3 M de NaCl a eu un impact significatif sur l'activité AI-2, comparé au milieu contrôle PUF. En effet, ce milieu « stressant » provoque une forte diminution de l'activité AI-2. Si cette activité diminue, cela veut également dire que la concentration de ces molécules diminue dans le surnageant. Pour les autres milieux « stressant » testés, aucun impact significatif sur la détection des molécules AI-2 n'a été observé.

On peut alors supposer que le stress osmotique a un impact sur le quorum sensing de *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA 1, et en particulier sur la concentration en molécules AI-2 dans le milieu extracellulaire. Ces résultats rejoignent ceux obtenus pour la souche de *Lactobacillus fermentum* dans l'étude de (Gu *et al.*, 2018). Effectivement, cette étude montre qu'une augmentation du stress osmotique induit une diminution de l'activité AI-2 chez cette souche (Gu *et al.*, 2018). Cependant en 2015, l'équipe de Yeo *et al.* ont montré l'inverse pour les souches *L.rhamnosus* GG, *L.rhamnosus* BFE5264, *L.plantarum* 299v et *L.plantarum* NR74. En effet, dans cette étude, l'augmentation du stress osmotique augmente l'activité AI-2 (Yeo *et al.*, 2015). Cela suggère alors que la modulation de l'activité AI-2 par des stress dépend de la souche.

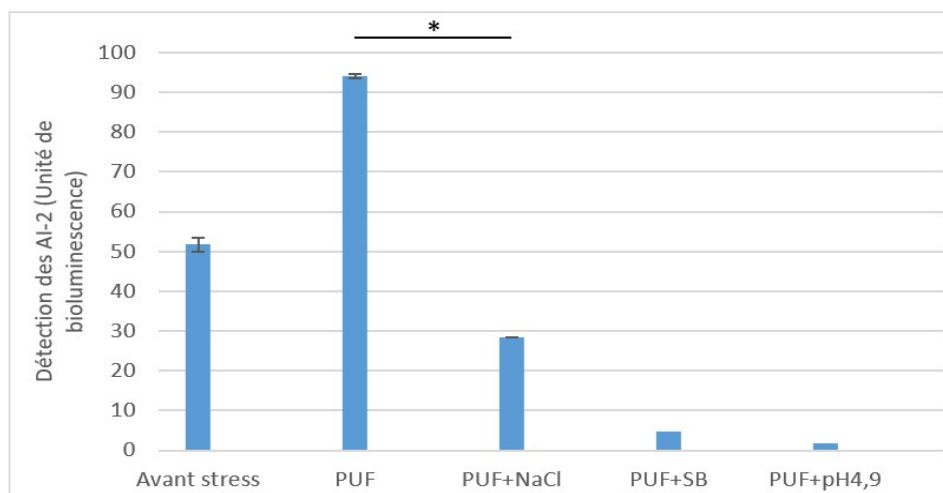


Figure 15 : Détection des molécules AI-2 par bioluminescence dans les surnageants des cultures de CIRM-BIA 1 après 4 heures d'incubation dans différents milieux « stressant ». La détection des molécules AI-2 au cours du temps a été représentée sous forme d'histogramme, obtenue par mesure de la bioluminescence. La barre « Avant stress » correspond au surnageant de culture en milieu de phase exponentielle avant l'application des stress. Le PUF est le contrôle, il correspond au surnageant de la culture à DO_{650nm} 0,5 après 4 heures d'incubation dans du milieu PUF stérile sans stress. Le PUF + NaCl est la culture à DO_{650nm} 0,5 remise en suspension du milieu PUF additionné de 0,3 M de NaCl. Le PUF + SB est la culture à DO_{650nm} 0,5 remise en suspension du milieu PUF additionné de 0,2 g/L de sels biliaires. Le PUF + pH 4,9 est la culture à DO_{650nm} 0,5 remise en suspension du milieu PUF à pH 4,9. Une Anova suivie d'un test de Tukey a été effectuée avec un seuil de significativité à 0,05 (*, P<0,05).

Une analyse en spectrométrie de masse permettant d'identifier et de quantifier les molécules de DPD sur les surnageants provenant du milieu contrôle et des milieux « stressants » a également être réalisée. Les analyses sont en cours. Cette analyse supplémentaire va permettre de savoir si les milieux « stressants » et en particulier si le stress osmotique a un impact significatif sur la concentration en DPD. Si c'est le cas, on pourra alors dire que la diminution de l'activité biologique AI-2 observée en présence d'un stress osmotique, était liée à la diminution de la concentration en DPD.

Conclusion finale et prospective

Propionibacterium freudenreichii joue un rôle à la fois en tant que ferments pour l'affinage des fromages à pâtes pressées cuites mais également en tant que probiotiques en modulant le système immunitaire de l'hôte et le microbiote intestinale. De façon surprenante, rien n'est connu dans la littérature sur la communication de type Quorum Sensing chez cette bactérie, alors que l'expression du gène *luxS* a été rapportée. L'étude du Quorum Sensing chez *Propionibacterium freudenreichii* semble nécessaire pour pouvoir connaître les mécanismes d'interactions microbiennes dans le contexte probiotique/hôte. Pour cela, durant ce stage, une étude du Quorum Sensing chez deux souches de *Propionibacterium freudenreichii*, CIRM-BIA 1 et CIRM-BIA 129, a été effectuée.

Les résultats obtenus montrent une activité de type Quorum Sensing AI-2 chez CIRM-BIA 1 et CIRM-BIA 129. L'expression du gène *luxS* semble constitutive. Ce gène code pour une enzyme LuxS qui va former du DPD pour ensuite donner spontanément des molécules AI-2. La concentration du DPD augmente lors de la phase exponentielle de croissance et ainsi celle de l'AI-2 également. Puis, en phase stationnaire de croissance, le ralentissement de l'activité métabolique de la bactérie, ainsi que la conversion du DPD en AI-2, conduisent à la diminution de la concentration en DPD. Les molécules AI-2, étant des auto-inducteurs, leur concentration augmente ou du moins reste stable.

Ces résultats ouvrent sur des perspectives de recherches. En effet, les études du Quorum Sensing réalisées se sont déroulées sur 4 jours (96 heures) de croissance. Il serait désormais intéressant de savoir ce qu'il se passe après ces 4 jours de croissance. L'activité AI-2 et la concentration en molécules signales correspondant diminue-t-elle après 4 jours ? Ou reste-elle stable ? La même étude réalisée sur 7 jours (168 heures) est-elle envisageable pour pouvoir répondre à ces questions ?

Une étude de l'impact des stress sur le Quorum Sensing de la souche CIRM-BIA 1 a également été réalisée. Cette étude montre que les stress appliqués ne semblent pas impacter le niveau d'expression du gène *luxS* après 4 heures d'incubation. Par contre, le stress osmotique a un impact significatif sur la présence des molécules AI-2.

Que ce soit les résultats de l'étude du Quorum Sensing ou ceux de l'impact des stress, ils suggèrent que chez *Propionibacterium freudenreichii* la régulation du système de communication de type Quorum Sensing est sûrement une régulation post-traductionnelles. En perspective, une analyse protéomique pourra être faite. Elle permettra de rechercher les modifications et les régulations post-traductionnelles des protéines impliquées dans le Quorum Sensing, tel que les régulateurs associés

au système LuxS/AI-2, chez *Propionibacterium freudenreichii*. De plus, une délétion du gène *luxS* pourra être réalisée permettant ainsi de rechercher les modifications phénotypiques chez les mutants dépourvus de ce gène.

Bibliographiques

Andersen, C.L., Jensen, J.L., and Ørntoft, T.F. (2004) Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Res* **64**: 5245–5250.

Baron, F., Cochet, M.-F., Ablain, W., Grosset, N., Madec, M.-N., Gonnet, F., *et al.* (2006) Rapid and cost-effective method for micro-organism enumeration based on miniaturization of the conventional plate-counting technique. *Lait* **86**: 251–257.

Bassler, B.L., and Losick, R. (2006) Bacterially Speaking. *Cell* **125**: 237–246.

Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., *et al.* (2009) The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* **55**: 611–622.

Cavero-Olguin, V.H., Hatti-Kaul, R., Cardenas-Alegria, O.V., Gutierrez-Valverde, M., Alfaro-Flores, A., Romero-Calle, D.X., and Alvarez-Aliaga, M.T. (2019) Stress induced biofilm formation in *Propionibacterium acidipropionici* and use in propionic acid production. *World J Microbiol Biotechnol* **35**: 101.

Coenye, T., Peeters, E., and Nelis, H.J. (2007) Biofilm formation by *Propionibacterium acnes* is associated with increased resistance to antimicrobial agents and increased production of putative virulence factors. *Research in Microbiology* **158**: 386–392.

Cousin, F.J., Louesdon, S., Maillard, M.-B., Parayre, S., Falentin, H., Deutsch, S.-M., *et al.* (2012) The first dairy product exclusively fermented by *Propionibacterium freudenreichii*: A new vector to study probiotic potentialities in vivo. *Food Microbiology* **32**: 135–146.

Cousin, F.J., Mater, D.D.G., Foligne, B., and Jan, G. (2010) Dairy propionibacteria as human probiotics: A review of recent evidence. *Dairy Sci Technol* <http://link.springer.com/10.1051/dst/2010032>. Accessed May 31, 2022.

Cummins, C., Johnson, J. (1992) The genus *Propionibacterium*, in A Balows, HG Truper, M Dworkin, W Harder, and KH Schleifer (eds.), *The Prokaryotes*: New York, USA, *Springer-Verlag Inc*, p. 834-849.

Deborde, C., and Boyaval, P. (2000) Interactions between Pyruvate and Lactate Metabolism in *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* : In Vivo ¹³ C Nuclear Magnetic Resonance Studies. *Appl Environ Microbiol* **66**: 2012–2020.

Eberhard, A., Burlingame, A.L., Eberhard, C., Kenyon, G.L., Nealson, K.H., and Oppenheimer, N.J. (1981) Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry* **20**: 2444–2449.

Falentin, H., Deutsch, S.-M., Jan, G., Loux, V., Thierry, A., Parayre, S., *et al.* (2010) The Complete Genome of *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA1T, a Hardy Actinobacterium with Food and Probiotic Applications. *PLoS ONE* **5**: e11748.

- Farrar, M.D., Ingham, E., and Holland, K.T. (2000) Heat shock proteins and inflammatory acne vulgaris: molecular cloning, overexpression and purification of a *Propionibacterium acnes* GroEL and DnaK homologue. *FEMS Microbiology Letters* **4**.
- Fuqua, W.C., Winans, S.C., and Greenberg, E.P. (1994) Quorum Sensing in Bacteria: the LuxR-LuxI Family of Cell Density-Responsive Transcriptional Regulators. *176*: 7.
- Gaucher, F., Bonnassie, S., Rabah, H., Leverrier, P., Pottier, S., Jardin, J., *et al.* (2019) Benefits and drawbacks of osmotic adjustment in *Propionibacterium freudenreichii*. *J Proteomics* **204**: 103400.
- Gu, Y., Li, B., Tian, J., Wu, R., and He, Y. (2018) The response of LuxS/AI-2 quorum sensing in *Lactobacillus fermentum* 2-1 to changes in environmental growth conditions. *Ann Microbiol* **68**: 287–294.
- Guo, M., Gamby, S., Zheng, Y., and Sintim, H. (2013) Small Molecule Inhibitors of AI-2 Signaling in Bacteria: State-of-the-Art and Future Perspectives for Anti-Quorum Sensing Agents. *IJMS* **14**: 17694–17728.
- Hervé, C., Fondrevez, M., Chéron, A., Barloy-Hubler, F., and Jan, G. (2007) Transcarboxylase mRNA: A marker which evidences *P. freudenreichii* survival and metabolic activity during its transit in the human gut. *International Journal of Food Microbiology* **113**: 303–314.
- Jan, G., Lan, A., and Leverrier, P. (2007) Dairy propionibacteria as probiotics. *Functional dairy products, Volume 2* 165–194.
- Jan, G., Leverrier, P., Pichereau, V., and Boyaval, P. (2001a) Changes in Protein Synthesis and Morphology during Acid Adaptation of *Propionibacterium freudenreichii*. *Appl Environ Microbiol* **67**: 2029–2036.
- Jan, G., Leverrier, P., Pichereau, V., and Boyaval, P. (2001b) Changes in protein synthesis and morphology during acid adaptation of *Propionibacterium freudenreichii*. *Appl Environ Microbiol* **67**: 2029–2036.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., and De Keersmaecker, S.C.J. (2010) Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nat Rev Microbiol* **8**: 171–184.
- Leverrier, P., Dimova, D., Pichereau, V., Auffray, Y., Boyaval, P., and Jan, G. (2003) Susceptibility and adaptive response to bile salts in *Propionibacterium freudenreichii*: physiological and proteomic analysis. *Appl Environ Microbiol* **69**: 3809–3818.
- Lupp, C., and Ruby, E.G. (2004) *Vibrio fischeri* LuxS and AinS: Comparative Study of Two Signal Synthases. *J Bacteriol* **186**: 3873–3881.
- Malik, A.C., Reinbold, G.W., and Vedamuthu, E.R. (1968) An evaluation of the taxonomy of *Propionibacterium*. *Can J Microbiol* **14**: 1185–1191.
- Moslehi-Jenabian, S., Gori, K., and Jespersen, L. (2009) AI-2 signalling is induced by acidic shock in probiotic strains of *Lactobacillus spp.* *International Journal of Food Microbiology* **135**: 295–302.
- Nealson, K.H., Platt, T., and Hastings, J.W. (1970) Cellular Control of the Synthesis and Activity of the Bacterial Luminescent System. **104**: 10.
- Parayre, S., Falentin, H., Madec, M.-N., Sivieri, K., Le Dizes, A.-S., Sohier, D., and Lortal, S. (2007) Easy DNA extraction method and optimisation of PCR-Temporal Temperature Gel Electrophoresis to identify the predominant high and low GC-content bacteria from dairy products. *Journal of Microbiological Methods* **69**: 431–441.
- Parker, C.T., and Sperandio, V. (2009) Cell-to-cell signalling during pathogenesis. *Cellular Microbiology* **11**: 363–369.

- Polkade, A.V., Mantri, S.S., Patwekar, U.J., and Jangid, K. (2016) Quorum Sensing: An Under-Explored Phenomenon in the Phylum Actinobacteria. *Front Microbiol* **7** <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.00131/abstract>. Accessed January 31, 2022.
- Prescott, R.D., and Decho, A.W. (2020) Flexibility and Adaptability of Quorum Sensing in Nature. *Trends in Microbiology* **28**: 436–444.
- Romero, D.X., Alegre-a, O.V.C., Olguin, V.H.C., and Aliaga, M.T.Ã. (2015) Detection of *luxS* gene expression under stressing factors for biofilm formation by *Propionibacterium acidipropionici* and *Propionibacterium freudenreichii*. *JBT* **5**: 604–613.
- Sivakumar, K.K., Jesudhasan, P.R., and Pillai, S.D. (2011) Detection of Autoinducer (AI-2)-Like Activity in Food Samples. In *Quorum Sensing*. Rumbaugh, K.P. (ed.). Humana Press, Totowa, NJ. pp. 71–82 http://link.springer.com/10.1007/978-1-60761-971-0_6. Accessed May 17, 2022.
- Sturme, M.H.J., Kleerebezem, M., Nakayama, J., Akkermans, A.D.L., Vaughan, E.E., and Vos, W.M. de (2002) Cell to cell communication by autoinducing peptides in gram-positive bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**: 11.
- Sun, Z., He, X., Brancaccio, V.F., Yuan, J., and Riedel, C.U. (2014) Bifidobacteria Exhibit LuxS-Dependent Autoinducer 2 Activity and Biofilm Formation. *PLoS ONE* **9**: e88260.
- Thierry, A. (2004) Varied volatile compounds are produced by *Propionibacterium freudenreichii* in Emmental cheese. *Food Chemistry* **87**: 439–446.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**: research0034.1.
- Von Freudenreichii, E., Orla-Jensen, O. (1906) Uber die in Emmentalerkäse stattfindene Propionsäure-gärung. *Zentralbl Bakteriol* ; 17: 529-546
- Waters, C.M., and Bassler, B.L. (2005) QUORUM SENSING: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 319–346.
- Wood, H.G. (1981) Metabolic Cycles in the Fermentation by Propionic Acid Bacteria. In *Current Topics in Cellular Regulation*. Elsevier, pp. 255–287 <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780121528188500219>. Accessed May 31, 2022.
- Xavier, K.B., and Bassler, B.L. (2003) LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Current Opinion in Microbiology* **6**: 191–197.
- Xu, G.-M. (2016) Relationships between the Regulatory Systems of Quorum Sensing and Multidrug Resistance. *Front Microbiol* **7** <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.00958/abstract>. Accessed February 2, 2022.
- Yeo, S., Park, H., Ji, Y., Park, S., Yang, J., Lee, J., *et al.* (2015) Influence of gastrointestinal stress on autoinducer-2 activity of two *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Ecology* **91**: fiv065.

Résumé / Abstract

Propionibacterium freudenreichii est un ferment couramment utilisé lors de l'affinage des fromages et également un probiotique qui module le système immunitaire et le microbiote intestinal. Ces utilisations suggèrent que ces bactéries interagissent entre elles et avec d'autres bactéries, dans différents environnements. Ces interactions pourraient correspondre à du quorum sensing (QS). Cependant, le QS n'est pas bien décrit chez les Propionibacteria. L'étude réalisée ici a deux objectifs : Savoir si *Propionibacterium freudenreichii* possède une activité QS ; Et savoir si cette dernière est impactée lors des stress causés par la fabrication du fromage ou par le système digestif. Pour cela, les souches de *P. freudenreichii* CIRM-BIA 1 et CIRM-BIA 129 ont été cultivées dans du perméat d'ultrafiltration de lait. A différents stades de croissance, l'expression de *luxS* a été suivie par RT-PCR quantitative. L'activité QS et la présence de la molécule AI-2 ont été suivies en utilisant la bioluminescence et la spectrométrie de masse, respectivement. De plus, différents stress (acide, sels biliaires et solution saline) ont été appliqués à la souche CIRM-BIA 1 pendant 4 heures, avant le suivi de l'expression de *luxS* par RT-qPCR. Grâce à ces études, il est montré que CIRM-BIA 1 et CIRM-BIA 129 possèdent bien une activité QS de type AI-2. Et que le stress osmotique a un impact significatif sur l'activité des molécules AI-2 chez CIRM-BIA 1.

Mots clés : *Propionibacterium freudenreichii*, Quorum Sensing, gène *luxS*, molécules AI-2, stress

Propionibacterium freudenreichii is a starter commonly used during the ripening of cooked pressed (Swiss-type) cheeses and also a probiotic that modulates the immune system and the intestinal microbiota. These effects suggest that Propionibacteria interact with each other and with other bacteria, in different environments. Such interactions may be Quorum Sensing (QS). However, QS is not well described in Propionibacteria. The study performed here has two objectives: To know if *Propionibacterium freudenreichii* has a QS activity; And to know if this last is impacted during stresses caused by cheese making or by the digestive system. For this purpose, strains of *P. freudenreichii* CIRM-BIA 1 and CIRM-BIA 129 were grown in milk ultrafiltration permeate. At different growth stages, *luxS* expression was followed by quantitative RT-PCR. QS activity and presence of AI-2 molecule were monitored using bioluminescence and mass spectrometry, respectively. Moreover, different stresses (acid, bile salts and saline) were applied to the CIRM-BIA 1 strain during 4 hours, prior to monitoring of *luxS* expression using RT-qPCR. Through these studies, it is shown that CIRM-BIA 1 and CIRM-BIA 129 do possess AI-2 type QS activity. And that osmotic stress has a significant impact on the activity of AI-2 molecules in CIRM-BIA 1.

Key words: *Propionibacterium freudenreichii*, Quorum Sensing, *luxS* gene, AI-2 molecules, stress