Evaluation du potentiel probiotique de lactobacilles buccaux

Johan Samot

▶ **To cite this version:**

Johan Samot. Evaluation du potentiel probiotique de lactobacilles buccaux. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Bordeaux Ségalen (Bordeaux 2), 2012. Français. NNT : . tel-02805535

HAL Id: tel-02805535
https://hal.inrae.fr/tel-02805535

Submitted on 6 Jun 2020

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

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

Année 2012

Thèse n° 1970

THÈSE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

Mention : Sciences, Technologie, Santé

Option : Microbiologie-Immunologie

Présentée et soutenue publiquement

Le 6 décembre 2012

Par Johan SAMOT

Né le 3 Juin 1983 à Fort-de-France

Evaluation du potentiel probiotique de lactobacilles buccaux

Membres du Jury

Pr Michael Kann, Université Bordeaux Segalen	Président
Pr Danièle Duffaut, Université Toulouse III Paul Sabatier	Rapporteur
Pr Christine Roques, Université Toulouse III Paul Sabatier	Rapporteur
Pr Catherine Béal, Inra-AgroParis Tech	Examinateur
Pr Patrick Lucas, ISVV- Université Bordeaux Segalen	Examinateur
Dr Cécile Badet, Université Bordeaux Segalen	Directeur

Résumé

La cavité buccale est un écosystème dynamique et complexe à l'équilibre fragile. A l'occasion de modifications des conditions environnementales ou d'une augmentation de la sensibilité de l'hôte, il y a rupture de cet équilibre. L'altération des conditions locales va permettre la croissance et le développement d'espèces pathogènes jusqu'alors faiblement représentées, ce qui va autoriser la survenue de diverses pathologies infectieuses orales. Devant l'insuffisance des solutions apportées par une prise en charge uniquement mécanique, des moyens supplémentaires doivent être envisagés. La stratégie probiotique ouvre une voie séduisante puisque l'on se propose de remplacer des bactéries pathogènes par des microorganismes ayant des effets bénéfiques sur la santé orale. L'objectif de ce travail vise donc à identifier des souches probiotiques parmi des isolats oraux de lactobacilles.

Pour cela, soixante six souches ont été évaluées. Afin de prédire leur persistance orale, trois méthodes différentes d'évaluation de l'adhérence ont été utilisées : une méthode sur tube de verre, la méthode MATS et un modèle de biofilm monoespèce. Des études *in vitro* ont été conduites pour déterminer si les lactobacilles pouvaient inhiber des pathogènes carieux (*Streptococcus mutans* et *Actinomyces viscosus*) et certains pathogènes parodontaux (*Fusobacterium nucleatu*m et *Porphyromonas gingivalis*) et pour identifier les mécanismes impliqués. Enfin, les capacités fermentaires de certaines souches ont été appréciées, afin d'éviter l'apparition d'effets délétères comme la déminéralisation carieuse.

Trois souches seulement ont montré des capacités d'adhérence intéressantes. Selon les critères que nous avions défini pour caractériser une activité comme antibactérienne, aucune souche n'a inhibé *P. gingivalis* et 9 souches ont été retenues pour leur pouvoir inhibiteur contre les autres pathogènes. Le mode d'action précis de l'inhibition reste encore à préciser. Dans les conditions de cette étude, aucune des souches évaluées pour son activité fermentaire n'a présenté un risque cariogène.

Ce travail a permis de mettre en évidence des souches intéressantes soit de part leur adhérence soit de part leur activité inhibitrice. Des études *in vitro* complémentaires semblent nécessaires (évaluation de la stimulation immunitaire, précision sur les mécanismes impliqués dans les effets observés) avant de poursuivre sur un modèle animal ou des études cliniques chez l'Homme.

Mots-clés : Lactobacillus. Cavité buccale. Probiotique. Adhérence. Antibactérien.

Abstract

The oral cavity is a complex and dynamic ecosystem with a delicate balance. On the occasion of changes in environmental conditions or an increase in the sensitivity of the host, a break can occur. The alteration of local conditions will allow the growth and development of pathogenic species hitherto poorly represented, which will allow the occurrence of various oral infectious diseases. Due to the lack of solutions given by a purely mechanical support, additional resources should be considered. Probiotic strategy appears as an attractive way since it proposes to replace pathogenic bacteria by microorganisms having beneficial effects on oral health. The aim of this study was therefore to identify probiotic strains among oral lactobacilli isolates.

To this end, sixty-six strains were evaluated. To predict persistence in mouth, three different methods of assessing adherence were used: a method on glass tube, the MATS method and a monospecie biofilm model. *In vitro* studies were conducted to determine whether lactobacilli could inhibit caries pathogens (*Streptococcus mutans* and *Actinomyces viscosus*) and some periopathogens (*Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis*) and to identify the mechanisms involved. Finally, the fermentation capacity of certain strains was assessed in order to avoid the occurrence of adverse effects such as carious demineralization.

Only three strains showed adhesion interesting capabilities. According to the criteria we defined to characterize an activity as antibacterial, no strain inhibited *P. gingivalis* and 9 strains were selected for their inhibitory potency against the others pathogens. The precise mode of action of the inhibition remains unclear. Under the conditions of this study, none of the strains tested for its fermentative activity has introduced a cariogenic risk.

This work has highlighted interesting strains because of their adhesion or because of their inhibitory activity. Additional *in vitro* studies seem necessary (evaluation of immune stimulation, precision of the mechanisms involved in the observed effects) before continuing in an animal model and clinical studies in humans.

Keywords : Lactobacillus. Oral cavity. Probiotic. Adherence. Antibacterial.

Table des matières

LISTE DES TABLEAUX **4**
LISTE DES FIGURES **5**
LISTE DES ABREVIATIONS **6**
LISTES DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS ISSUES DE LA THESE **7**
1. INTRODUCTION **9**
2. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE **12**
L'ECOSYSTEME BUCCAL : UNE HOMEOSTASIE FRAGILE **13**
2.1. LE BIOFILM DENTAIRE 15
2.2. LA CARIE DENTAIRE 17
2.3. LES MALADIES PARODONTALES 20
2.4. L'HALITOSE 22
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DES PROBIOTIQUES **23**
2.5. DEFINITION 23
2.6. MODES D'ACTION DES PROBIOTIQUES 25
2.6.1. Adhésion bactérienne *26*
2.6.2. Propriétés anti bactériennes *28*
2.6.3. Stimulation immunitaire *29*
2.6.4. Innocuité des souches *30*
2.7. LES PROBIOTIQUES EN SANTE GENERALE 30
2.8. LES PROBIOTIQUES EN SANTE BUCCO-DENTAIRE 31
2.8.1. Etudes in vitro *31*
2.8.2. Etudes cliniques *32*
LES LACTOBACILLES, PROBIOTIQUES MAJEURS? **34**
2.9. ADHESION DES LACTOBACILLES 34
2.10. LA PRODUCTION DES MOLECULES ANTIBACTERIENNES 35
2.11. STIMULATION IMMUNITAIRE 36
2.12. INNOCUITE DES LACTOBACILLES 37
3. MATERIELS ET METHODES **38**
3.1. SOUCHES BACTERIENNES ET CULTURES 39
3.2. EVALUATION DES PROPRIETES D'ADHERENCE DES LACTOBACILLES 41
3.2.1. Adhérence sur tube de verre *41*
3.2.2. Adhésion sur disque d'hydroxyapatite *41*

3.2.3. Méthode MATS ... *43*
3.3. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE ... 43
3.3.1. Méthode de type antibiogramme ... *43*
3.3.2. Méthode de co-culture bactérienne en milieu liquide ... *44*
3.3.3. Méthode d'inhibition bactérienne en gélose superposée (double gélose) ... *45*
3.3.4. Méthode colorimétrique d'évaluation de la production de peroxyde d'hydrogène ... *46*
3.3.5. Essai d'extraction de bactériocine : utilisation d'une souche productrice connue (L. gasseri LA39) ... *46*
3.3.6. Evaluation de l'effet inhibiteur de l'acide lactique sur nos bactéries pathogènes ... *47*
3.4. RECHERCHE DES DETERMINANTS GENETIQUES AYANT UNE EXPRESSION PHENOTYPIQUE POTENTIELLEMENT PROBIOTIQUE ... 48
3.4.1. Recherche du gène de la gassericine A chez nos souches identifiées comme L. gasseri ... *48*
3.4.2. Recherche du gène de la glycérol déshydratase ... *48*
3.4.3. Recherche de gènes codant pour des glucosyltransférases (GTFs) ... *49*
3.5. MESURE DE L'ACTIVITE FERMENTAIRE DES LACTOBACILLES ... 49
4. RESULTATS ... 51
4.1. EVALUATION DES PROPRIETES D'ADHERENCE DES LACTOBACILLES ... 52
4.2. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE ... 56
4.2.1. Méthode de type antibiogramme ... *56*
4.2.2. Méthode de co-culture en milieu liquide ... *57*
4.2.3. Méthode de la double gélose ... *57*
4.2.4. Méthode colorimétrique d'évaluation de la production de peroxyde d'hydrogène ... *60*
4.2.5. Essai d'extraction de bactériocine : utilisation d'une souche productrice connue L. gasseri LA39 *61*
4.2.6. Evaluation de l'effet inhibiteur de l'acide lactique sur nos bactéries pathogènes ... *61*
4.3. RECHERCHE DES DETERMINANTS GENETIQUES AYANT UNE EXPRESSION PHENOTYPIQUE POTENTIELLEMENT PROBIOTIQUE ... 62
4.3.1. Recherche du gène de la gasséricine A chez nos souches identifiées comme L. gasseri ... *62*
4.3.2. Recherche du gène de la glycérol déshydratase ... *62*
4.3.3. Recherche de gènes codant pour des glucosyltransférases ... *64*
4.4. MESURE DE L'ACTIVITE FERMENTAIRE DES LACTOBACILLES ... 65
5. DISCUSSION ... 69
6. CONCLUSION ... 77
RÉFÉRENCES ... 80
ANNEXES ... 97

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux genres bactériens de la cavité buccale 14
Tableau 2 : Principaux streptocoques de la cavité orale humaine 18
Tableau 3 : Principales espèces de lactobacilles retrouvés dans la cavité buccale 19
Tableau 4: Principales espèces d'*Actinomyces* retrouvées dans la cavité buccale 20
Tableau 5 : Exemples de micro-organismes ayant un intérêt probiotique à ce jour 24
Tableau 6 : Mécanismes hypothétiques de l'action des probiotiques dans la cavité buccale selon Meurman 25
Tableau 7 : Exemples de bactériocines décrites chez des lactobacilles 36
Tableau 8: Soixante six lactobacilles testés appartenant à la collection propre du laboratoire de microbiologie de l'UFR d'Odontologie de l'Université Bordeaux Segalen 40
Tableau 9 : Lactobacilles du commerce utilisés dans notre étude 41
Tableau 10 : Espèces de lactobacilles retrouvées dans notre étude 52
Tableau 11 : Résultats des tests d'adhérence sur tube de verre 54
Tableau 12 : Mesure de l'hydrophobicité de surface des 10 souches adhérentes sur tube de verre 55
Tableau 13 : Résultats de l'adhérence des 13 souches sur disques d'hydroxyapatite recouvert de salive 56
Tableau 14 : Isolats cliniques positifs pour la production de peroxyde d'hydrogène 60
Tableau 15 : Diamètres d'inhibition mesurés en fonction de la concentration d'acide lactique pour les 4 pathogènes oraux de l'étude 61
Tableau 16 : Synthèse des valeurs pHmétriques pour les différentes souches en milieu FMM ± sucre à T = 30min 68

Liste des figures

Figure 1 : Mise en place du biofilm dentaire 16
Figure 2 : Adhérence sur tube de verre (échelle visuelle, classification de Murchison)..... 53
Figure 3 : Diamètres d'inhibition observés contre les 4 pathogènes oraux utilisés..... 59
Figure 4 : Méthode colorimétrique d'évaluation de la production de peroxyde d'hydrogène. . 60
Figure 5 : Gel d'électrophorèse pour la recherche du gène de la gasséricine A 62
Figure 6 : Gel d'électrophorèse pour la recherche du gène de la glycérol déshydratase 63
Figure 7 : Gels d'électrophorèse pour la recherche de gènes codant pour des glucosyltransférases 64
Figure 8 : Courbes d'évolution du pH d'un milieu (FMM ± sucre) selon la bactérie qui y est placée au cours du temps..... 67

Liste des abréviations

ATCC : American Type Cell Culture
BHI : Brain Heart Infusion (Bouillon coeur cervelle)
CFU : Colony Forming Unit (unité formant colonie)
CSV : Composés Soufrés Volatils
DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DO : Densité Optique
DSM : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
DVLO : Derjauin-Landau-Verwey-Overbeek
EPS : Exopolysaccharides
FMM : Fermentation Minimum Medium
FUM : Fluid Universal Medium
GRAS : Generally Recognised As Safe
GTF : Glucosyltransférase
HA : Hydroxyapatite
HPA : Hydroxypropionaldéhyde
LAPTg : Levure Autolysat, Peptone, Tryptone, Tween 80 et glucose
MATS : Microbial Adhesion To Solvent
MATH : Microbial Adhesion To Hydrocarbons
MRS : de Man, Rogosa, Sharpe
PAGE : PolyAcrylamid Gel Electrophoresis
PBS : Phosphate Buffered Saline
PCR : Polymerase Chain Reaction
RAPD : Random Amplification of Polymorphic DNA
Rpm : Rotation par minute
SDS : Sodium Dodécyl Sulfate
TAE : Tris-Acétate-EDTA
TBE : Tris-Borate-EDTA
TMB : 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine
TS : Tryptone-Soja
WCA : Wilkins - Chalgren Anaerobe

Listes des publications et communications issues de la thèse

Publications

1. **Adherence capacities of oral lactobacilli for potential probiotic purposes,** Samot J, Lebreton J, Badet C. Anaerobe 17 (2011) 69-72.

2. **Antibacterial activity of probiotic candidates for oral health**, Samot J, Badet C. Anaerobe (2012) (sous presse).

Communications affichées

Internationales

1. **Experimental studies of probiotic traits of wild oral lactobacilli.** Samot J, Badet C. Anaerobe 2012, the 11th biennial congress of the Anaerobe Society of the Americas, San Francisco, USA, 2012

Nationales

1. **Evaluation du potentiel probiotique de lactobacilles buccaux : mécanismes d'adhésion.** Samot J, Badet C. 17ème colloque du Club des Bactéries Lactiques, Nancy, France. 2010

2. **Recherche des gènes codant pour des glycosyltransférases chez des lactobacilles salivaires, candidats probiotiques.** Samot J, Badet C. 18ème colloque du Club des Bactéries Lactiques, Clermont-Ferrand, France. 2012

1. Introduction

Au début du XXème siècle, Elie Metchnikoff remarque que la longévité et la bonne santé des paysans bulgares est liée à leur consommation de produits laitiers fermentés et suggère que certains micro-organismes pourraient exercer des effets bénéfiques sur la santé humaine. Provenant de l'expression grecque « pro bios » qui signifie littéralement « pour la vie », le terme probiotique est proposé pour la première fois en 1965 par Lilly et Stillwell pour définir des substances produites par un micro-organisme stimulant la croissance d'autres microorganismes (145). Cette définition évolue rapidement et bientôt le terme définit des micro-organismes qui ont des effets positifs sur la santé en contribuant au maintien de l'équilibre du microbiote dans lequel ils se trouvent. Ces effets ont été particulièrement étudiés au niveau intestinal et de nombreuses études cliniques valident l'utilisation raisonnée des probiotiques.

La cavité orale des êtres humains est un écosystème particulier, ouvert sur l'extérieur, habité par de nombreux microorganismes dont des centaines d'espèces bactériennes dont la plupart sont commensales et nécessaires pour maintenir l'équilibre de cet écosystème. Pourtant, à l'occasion de certaines perturbations (apports glucidiques importants, dérégulation du contrôle microbien, sensibilité accrue de l'hôte), une rupture de cet équilibre va se produire ce qui va permettre le développement des pathologies infectieuses (caries et maladies parodontales principalement) de la cavité buccale. Même si des études ont mis en évidence les principaux pathogènes impliqués dans ces pathologies, un agent étiologique unique ne peut pas être isolé et ceci contrairement aux postulats de la théorie classique de Koch. Cela a été clairement démontré dans la maladie parodontale, où des espèces bactériennes qui appartiennent à des groupes taxonomiques très différents sont connues pour être impliquées dans la maladie.

Dans le contexte actuel de résistance bactérienne aux antibiotiques, la lutte contre les infections bactériennes fait de plus en plus appel à de nouveaux moyens, c'est ainsi que le concept de thérapeutiques basées sur l'utilisation de probiotiques a été considéré pour une application en santé buccale. La plupart des études menées ont utilisées des souches commerciales mais peu ont été conduites sur des souches sauvages.

C'est dans ce cadre que vient s'inscrire ce travail dont l'objectif était de mettre en évidence chez des lactobacilles isolés dans la cavité buccale, des caractéristiques phénotypiques et génétiques qui feraient d'eux de potentielles souches probiotiques. Pour cela, l'adhérence, les effets antibactériens et l'innocuité des souches ont été évalués.

Notre propos s'organise en quatre chapitres : une synthèse bibliographie du sujet traité, un chapitre qui détaille les matériels et méthodes utilisés, suivi d'une présentation des résultats de cette étude qui seront ensuite discutés dans un quatrième et dernier chapitre.

La synthèse bibliographie se compose de trois parties. Après une présentation générale du biofilm dentaire et des principales pathologies qui lui sont associées, une synthèse sera faite sur les probiotiques, leur définition, leurs mécanismes d'action et leur utilisation. La dernière partie résume les caractéristiques probiotiques des lactobacilles traités dans la littérature.

La majeure partie des matériels et méthodes est exposée dans le deuxième chapitre (quelques éléments sont placés en annexe). On y retrouve notamment la description des méthodes d'adhérence, des méthodes d'évaluation de l'inhibition et des méthodes moléculaires utilisées.

Le troisième chapitre présente l'ensemble des résultats tirés de cette étude. L'organisation de leur présentation est basée sur celle du chapitre matériels et méthodes.

Enfin, le dernier chapitre discute des résultats obtenus et justifie les orientations prises dans cette étude.

Ce manuscrit s'achève par une conclusion qui souligne les résultats marquant de ce travail et présente les perspectives et nouvelles orientations que devraient amener les travaux ultérieurs.

2. Synthèse Bibliographique

L'écosystème buccal : une homéostasie fragile

Chez l'Homme, la flore buccale fait partie d'un écosystème complexe à l'équilibre fragile. Cette flore est constituée de divers microorganismes : des parasites eucaryotes, des champignons, des levures, des virus, des mycoplasmes et de plus de 700 espèces bactériennes (Tableau 1) (84, 157, 188). Ces microorganismes peuvent être présents sous forme planctonique mais sont le plus souvent associés au sein d'un biofilm. Cette association apparaît comme une réponse adaptative à un milieu défavorable. Elle conduit à des modifications des fonctions cellulaires, à l'expression de facteurs de virulence et métaboliques et présente des avantages pour les bactéries en facilitant :

- la résistance aux antibactériens et autres conditions environnementales défavorables,
- les échanges nutritionnels et les coopérations métaboliques,
- les échanges génétiques (69).

L'établissement du biofilm dentaire est physiologique et sa composition dépend largement de facteurs environnementaux tels que brossage, apports nutritifs, température ou variation de pH. Ce biofilm polymorphe en fonction des différentes niches buccales (langue, site sous-gingival, surface amélaire...), a de nombreux effets bénéfiques pour l'hôte notamment en contribuant au développement du système immunitaire local, au maintien de l'homéostasie et au contrôle de la colonisation de la muqueuse par des microorganismes pathogènes (10, 155, 158). Malgré leur diversité, la composition de ces communautés microbiennes reste pourtant relativement stable dans le temps (homéostasie microbienne). Cette stabilité ne signifie pas une relation passive avec l'hôte, mais elle reflète plutôt un équilibre dynamique entre les espèces qui les composent et des facteurs propres à l'hôte comme le système immunitaire ou des facteurs nutritionnels. Cependant comme dans tout écosystème, l'homéostasie microbienne peut se rompre à l'occasion de la survenue d'un changement brutal dans les paramètres locaux qui va profiter à la croissance d'espèces potentiellement pathogènes faiblement représentées et qui peuvent alors faire preuve d'une virulence accrue et montrer une sensibilité moindre aux agents antimicrobiens (155, 264).

Cocci		Bacilles	
Aérobies et anaérobies facultatifs		Anaérobies facultatifs	
Gram positif	Gram négatif	Gram positif	Gram négatif
Abiotrophia *Enterococcus* *Gemella* *Granulicatella* *Staphylococcus* *Streptococcus*	*Moraxella* *Neisseria*	*Actinomyces* *Corynebacterium* *Lactobacillus* *Rothia*	*Acinetobacter* *Aggregatibacter* *Campylobacter* *Capnocytophaga* *Eikenella* *Haemophilus* *Klebsiella* *Pseudomonas*
Anaérobies stricts		Anaérobies stricts	
Gram positif	Gram négatif	Gram positif	Gram négatif
Anaerococcus *Finegoldia* *Micromonas* *Peptococcus* *Peptoniphilus* *Peptostreptococcus*	*Anaeroglobus* *Veillonella*	*Actinomyces* *Atopobium* *Bifidobacterium* *Bulleidia* *Clostridium* *Cryptobacterium* *Eggerthella* *Eubacterium* *Mogibacterium* *Olsenella* *Parascardovia* *Propionibacterium* *Pseudoramibacter* *Scardovia* *Shuttleworthia* *Slackia*	*Bacteroides* *Centipeda* *Desulfomicrobium* *Dialister* *Filifactor* *Fusobacterium* *Leptotrichia* *Porphyromonas* *Prevotella* *Selenomonas* *Tannerella*
On retrouve aussi dans la cavité buccale, le genre *Mycoplasma* et des espèces du phylum des Spirochètes (uniquement du genre *Treponema*) (64, 266)			

Tableau 1 : Principaux genres bactériens de la cavité buccale (inspiré de Chardin et al.)(37)

2.1.Le biofilm dentaire

Ce biofilm a le même mode de formation que tous les biofilms bactériens c'est-à-dire qu'il se développe en plusieurs phases : une phase d'approche du support, une phase d'adhérence, une phase de maturation et une phase de dispersion (cf chapitre sur adhérence bactérienne). La particularité du biofilm dentaire (ou plaque dentaire) est qu'il s'établit sur une structure particulière qui porte le nom de pellicule acquise exogène (PAE). En effet, rapidement après le brossage commence à se déposer sur les surfaces dentaires, une fine pellicule composée de mucines, glycoprotéines et protéines (dont des enzymes) en provenance des fluides oraux (salive et fluide gingival) (94).

L'établissement du biofilm est soumis à une chronologie particulière, les bactéries le constituant n'ayant pas toutes les mêmes propriétés d'adhésion. Il a été montré, en utilisant des méthodes d'hybridation *in situ* en fluorescence que les premières bactéries à se déposer sur la pellicule acquise exogène appartiennent aux genres *Streptococcus* et *Actinomyces* (187). Ces bactéries font partie des espèces pionnières qui sont les seules à pouvoir adhérer à la pellicule acquise (Figure 1). De plus, pour un même genre bactérien, des différences inter-espèces existent. Plusieurs auteurs ont montré que les streptocoques du groupe mitis adhèrent plus facilement à la PAE que les streptocoques du groupe mutans (65, 144, 180). Après la mise en place de ces bactéries pionnières, d'autres espèces vont venir coloniser le biofilm dentaire. Ce phénomène qui contribue à l'accroissement du biofilm avec les divisions cellulaires et les phénomènes de co-agrégation correspond à l'étape de maturation du biofilm. Au fur et à mesure que ce biofilm s'épaissit de nouvelles conditions environnementales apparaissent. Par exemple, l'existence de zones plus pauvres en oxygène va favoriser la croissance des bactéries anaérobies. L'équilibre du biofilm sera être atteint en 2 à 3 semaines en l'absence de brossage. A ce stade, il peut contenir jusqu'à 10^9 bactéries par mg de matière (37). Certaines peuvent alors se détacher du biofilm et aller coloniser d'autres sites, sous l'effet des variations physico-chimiques environnantes, ceci constituant la phase de dispersion.

Le biofilm, malgré sa diversité, est donc composé d'une flore commensale relativement stable, en perpétuel renouvellement et en équilibre avec son environnement. C'est à la faveur de la rupture de cet équilibre que peuvent survenir les pathologies microbiennes de la cavité buccale.

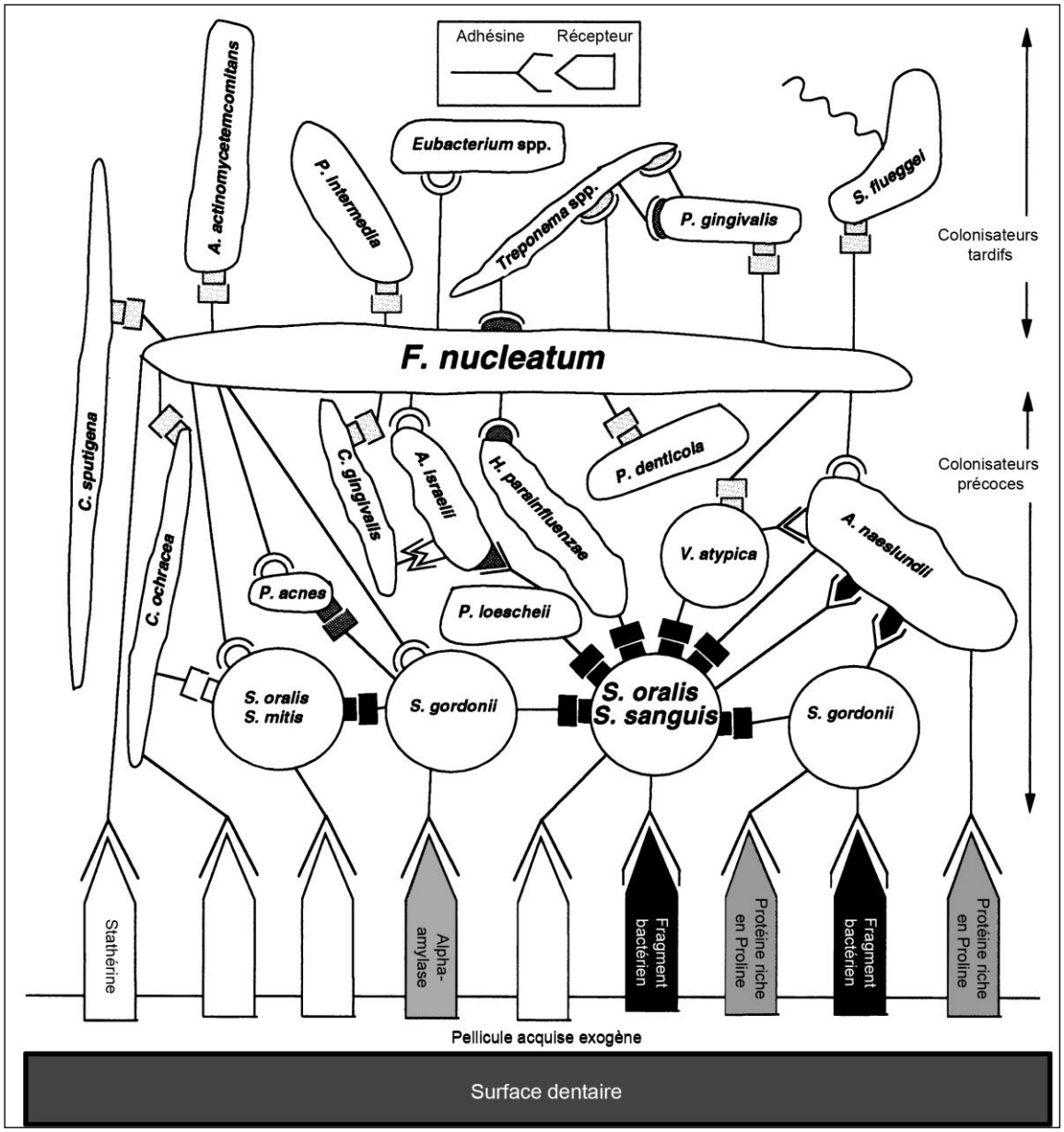


Figure 1 : Mise en place du biofilm dentaire (adapté de Kolenbrander et al.) (128)

2.2.La carie dentaire

La carie dentaire est une maladie polybactérienne chronique et multifactorielle qui se manifeste par une déminéralisation des tissus durs de la dent. Cette déminéralisation est due à la production d'acides par les bactéries fermentaires présentes au sein de la plaque dentaire. Cette production, fortement corrélée à l'alimentation, s'explique par la richesse du contenu de celle-ci en hydrates de carbone tels que le saccharose, le glucose ou encore le fructose. Le saccharose est souvent considéré comme très cariogénique d'une part car il est introduit artificiellement dans de nombreux produits alimentaires et d'autre part parce qu'il est très fermentescible à cause de son faible poids moléculaire. La fermentation des sucres va entraîner la baisse de pH au niveau des surface dentaires ; cette chute de pH dans les conditions normales est compensée par le pouvoir tampon de la salive (152). Dans des conditions de prises alimentaires répétées ou d'alimentation trop sucrée, le pouvoir tampon de la salive est débordé et celle-ci ne joue plus son rôle. Il se produit alors un abaissement durable de la valeur de pH au sein de la plaque dentaire, et ce d'autant plus, qu'au sein du biofilm constitué la salive a une faible diffusion (111). Ce pH qui est initialement autour de 6.5-7 va chuter rapidement en dessous d'une valeur dite critique (pH 5.5), à partir de laquelle l'hydroxyapatite (composant majeur de l'émail) commence à être dissous de façon irréversible (235). Parallèlement, cet environnement acide au sein de la plaque a tendance à sélectionner des bactéries tolérantes à ces conditions particulières ; ces bactéries sont dites aciduriques. Ce phénomène modifiant l'homéostasie établie est à la base de la théorie de la plaque écologique de Marsh (156). Les streptocoques du groupe mutans ainsi que les lactobacilles sont les principales bactéries profitant de ce changement, et sont donc considérées comme les principales bactéries cariogènes. On retrouve cependant également parmi les bactéries cariogènes, le genre *Actinomyces* qui est fortement associé à certains types de caries.

- Le genre *Streptococcus*

Les streptocoques sont des cocci à Gram positif, catalase-négatif, asporogènes le plus souvent non encapsulés, immobiles, catalase négative. De par toutes ces caractéristiques et leur métabolisme fermentaire, ils sont classés dans le groupe des bactéries lactiques. Ces bactéries sont typiquement organisées en chaînettes. La classification actuelle les regroupe en 6 groupes phylogéniques (*anginosus*, *bovis*, *mitis*, *mutans*, *pyogenic* et *salivarius*) selon la séquence de

leur ADNr 16S (179). Les streptocoques oraux regroupent des espèces appartenant à 4 groupes phylogénétiques distincts :

Groupe anginosus	**Groupe mitis**	**Groupe mutans**	**Groupe salivarius**
S. anginosus	*S. australis*	*S. criceti*	*S. salivarius*
S. constellatus	*S. cristatus*	*S. devriesei*	subsp. *salivarius*
subsp. constellatus	*S. gordonii*	*S. downei*	subsp. *thermophilus*
subsp. pharyngis	*S. infantis*	*S. mutans*	*S. vestibularis*
S. intermedius	*S. mitis*	*S. ratti*	
	S.oligofermentans	*S. sobrinus*	
	S. oralis		
	S. parasanguinis		
	S. peroris		
	S. sanguinis		

Tableau 2 : Principaux streptocoques de la cavité orale humaine (37, 179)

Les streptocoques oraux sont les bactéries les plus nombreuses, représentant plus de 20%, de la flore commensale de la cavité buccale (26, 179). Il a été clairement démontré que certains streptocoques oraux jouaient un rôle important dans l'initiation de la carie dentaire (242). Outre leur propriété d'acido-résistance, leur pathogénicité est fortement associée à leurs propriétés d'adhésion (15). En effet, si les streptocoques mutans sont impliqués dans le développement de la maladie carieuse, c'est que leur pouvoir cariogène est dû aux facteurs de virulence déjà évoqués (acidogenèse, acidurie et adhérence).

- Le genre *Lactobacillus*

Le genre *Lactobacillus* appartient au groupe des bactéries lactiques et regroupe une diversité d'organismes en forme de bâtonnet, Gram-positifs, catalase-négatifs (bien que quelques souches décomposent faiblement H_2O_2 par une pseudo-catalase), immobiles ou mobiles et asporogènes (59, 245). Plus de 80 espèces sont regroupées au sein du genre *Lactobacillus*, qui représente l'un des genres les plus importants de la famille des bactéries lactiques (49). Les lactobacilles sont strictement fermentaires et peuvent être séparés en trois groupes (44, 59) :

- Le groupe I se compose de lactobacilles homofermentaires stricts qui fermentent les hexoses en produisant presque exclusivement du lactate selon la voie d'Embden-Meyerhof (glycolyse). Il n'y a pas de fermentation des pentoses ni du gluconate.
- Le groupe II se compose de lactobacilles hétérofermentaires facultatifs. Ils fermentent les hexoses selon la voie de la glycolyse et produisent ainsi quasi exclusivement du lactate et peuvent fermenter les pentoses en lactate et acétate par une phosphokétolase inductible.
- Le groupe III se compose de lactobacilles hétérofermentaires stricts qui fermentent les hexoses en lactate, acétate ou éthanol et dioxyde de carbone (CO_2) et qui fermentent également les pentoses en lactate et acétate.

Groupe I	**Groupe II**	**Groupe III**
L. acidophilus	*L. casei*	*L. brevis*
L. delbrueckii	*L. paracasei*	*L. buchneri*
L. helveticus	*L. plantarum*	*L. fermentum*
L. salivarius	*L. rhamnosus*	
	L. sake	

Tableau 3 : Principales espèces de lactobacilles retrouvés dans la cavité buccale (inspiré de Chardin et *al.*) (37)

Les lactobacilles colonisent la cavité orale très tôt dans la vie de l'Homme, avant l'âge de un an (13, 229). Parmi la diversité de la flore bactérienne orale, les lactobacilles ne sont en aucun cas l'espèce la plus représentée. Ils constituent environ 1% de la microflore buccale cultivable chez l'humain (Tableau 3). Les espèces les plus souvent retrouvées dans la salive sont *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei, Lactobacillus fermentum, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus rhamnosus* et *Lactobacillus salivarius.* Certaines espèces de lactobacilles ont été impliquées dans le processus carieux et plus particulièrement dans la progression de la lésion au sein de la dentine. Ces espèces que l'on isole le plus dans les lésions carieuses sont *L. acidophilus, L. casei, L. fermentum* et *L. rhamnosus* (238).

- Le genre *Actinomyces*

C'est un groupe de bacilles polymorphes anaérobies stricts ou facultatifs, à Gram positif, non alcoolo-acido-résistants, immobiles, asporogènes. Les produits de métabolisme glucidique sont les acides succinique, acétique et lactique. Chez l'homme, les espèces du genre *Actinomyces* font partie de la flore endogène commensale des muqueuses des voies aéro-digestives supérieures, des tractus intestinal et vaginal (37). Une dizaine d'espèces d'*Actinomyces* est retrouvée au niveau de la cavité buccale (Tableau 4). Deux espèces majeures, *Actinomyces viscosus* et *Actinomyces naeslundii* colonisent la surface des dents et il semblerait que *A. viscosus* domine dans les caries radiculaires (38, 275).

Anaérobies facultatifs	**Anaérobies stricts**
A. graevenitzii	*A. georgiae*
A. naeslundi	*A. gerencseriae*
A. radicidentis	*A. israelii*
A. viscosus	*A. meyeri*
	A. odontolyticus
	A. oricola

Tableau 4: Principales espèces d'*Actinomyces* retrouvées dans la cavité buccale (inspiré de Chardin et al.) (37)

2.3.Les maladies parodontales

Les maladies parodontales correspondent à l'ensemble des pathologies inflammatoires ou dégénératives affectant les tissus de soutien de la dent (ou parodonte). Ces maladies se divisent en 2 grandes catégories : les gingivites et les parodontites.

Les gingivites correspondent à toute inflammation limitée au parodonte superficiel (pas d'extension à l'os sous-jacent). Cet état inflammatoire est directement lié à la présence de la plaque dentaire, comme l'ont montré Loe et al. dans leurs expériences de gingivites expérimentales (148). Bien qu'une composante microbienne locale soit nécessaire, certaines pathologies générales ou affections systémiques ont un caractère favorisant.

Les parodontites sont des lésions infectieuses avancées du parodonte et font souvent suite aux gingivites. La présence de certaines bactéries et une réponse inflammatoire intense entraînent la destruction des tissus de soutien de la dent (os, muqueuse gingivale). Comme pour les gingivites, la gravité de l'atteinte peut être amplifiée par la présence de paramètres locaux et généraux favorisants comme des restaurations iatrogènes, un trauma occlusal, une immunodépression ou des modifications endocriniennes.

Le passage de l'état sain à l'état de maladie parodontale s'accompagne du passage progressif à une flore plus riche en bactéries anaérobies et de bactéries à Gram négatif : ce phénomène porte le nom de dérive anaérobie (156). Parmi les espèces les plus fréquemment impliquées dans les maladies parodontales *Fusobacterium nucleatum* et *Porphyromonas gingivalis* jouent un rôle prépondérant dans certaines formes de cette maladie (24, 228, 274). Il existerait d'ailleurs entre ces 2 espèces une co-agrégation qui leur serait très profitable, améliorant même leur survie et leur pathogénicité (66, 193, 212, 241).

- *Fusobacterium nucleatum*

Fusobacterium nucleatum est un bacille fusiforme à Gram négatif, anaérobie strict, asporogène et non mobile. Il produit essentiellement de l'acide butyrique lors de la métabolisation des hydrates de carbone. Chez l'homme, les espèces du genre *Fusobacterium* font partie de la flore endogène commensale des muqueuses des voies aéro-digestives supérieures, des tractus intestinal et vaginal.

Au sein du biofilm dentaire, *F. nucleatum* joue un rôle de pont grâce à ses propriétés de co-agrégation avec les espèces colonisatrices précoces et tardives (Figure 1). *Fusobacterium nucleatum* est constamment présent dans la flore lors de l'initiation de la maladie parodontale (37).

- *Porphyromonas gingivalis*

Porphyromonas gingivalis est un bacille anaérobie strict, Gram négatif, immobile, encapsulé, non sporulé, asaccharolytique et pigmenté. Le genre *Porphyromonas* est relativement peu représenté, il contient actuellement une douzaine d'espèces dont seulement quatre sont d'origine humaine : *Porphyromonas asaccharolytica*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* et *Porphyromonas catoniae*, les trois dernières étant des isolats buccaux (37). Parmi ces isolats buccaux, *P. gingivalis* est largement majoritaire. Il est plus

particulièrement associé aux parodontites agressives, il jouerait en effet un rôle majeur dans la dysbiose à l'origine de la pathologie parodontale (57).

2.4.L'halitose

L'halitose est définie par une haleine qui peut être dérangeante pour les autres et soi-même. Elle prend son origine principalement dans la zone de l'oropharynx (enduit lingual, maladies parodontales, pharyngite, ...) mais des causes extra orales sont possibles comme les sinusites ou des maladies systémiques (210, 262).

Dès le début des années 1960, Tonzetich et Richter reconnaissent le rôle des composés soufrés volatils (CSV) dans la mauvaise haleine (203, 257). Bien que d'autres molécules (polyamines, acides gras,...) semblent aussi impliquées (86, 129, 149), les CSV jouent un rôle prépondérant (262). Ces composés ont rapidement été identifiés comme provenant principalement du métabolisme des bactéries orales (165) et Persson et al. ont déterminé les espèces *Fusobacterium nucleatum* et *Porphyromonas gingivalis* comme faisant partie de celles qui produisent le plus de composés soufrés volatils (191).

Etude bibliographique des probiotiques

2.5.Définition

La définition des probiotiques n'a cessé d'évoluer au cours du temps (249). Actuellement, les probiotiques sont définis comme des microorganismes vivants, qui lorsqu'ils sont ingérés en quantité adéquate, exercent des effets bénéfiques sur la santé humaine, au-delà des effets nutritionnels traditionnels (89). Cette définition a été approuvée par l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (ONUAA) et l'Organisation mondiale de la santé (OMS). L'établissement de normes strictes par des groupes d'experts internationaux de ces deux instances a permis d'encadrer le qualificatif "probiotique". Ainsi, pour qu'une souche bactérienne puisse acquérir l'appellation probiotique, elle doit être parfaitement caractérisée. Le genre et l'espèce du microorganisme doivent être identifiés selon des méthodes acceptées à l'échelle internationale et sa nomenclature doit être corroborée par référence aux listes approuvées des noms bactériens. De plus, des études *in vitro* et *in vivo* doivent être réalisées pour mettre en évidence les mécanismes d'action du probiotique, afin de prédire son champ d'utilisation et d'identifier ses effets secondaires potentiels. L'ONUAA et l'OMS recommandent que les souches de bactéries probiotiques soient caractérisées pour leur spectre de résistance aux antibiotiques, leurs activités métaboliques et hémolytiques, leur capacité à produire des toxines, leur pouvoir infectieux dans des modèles animaux immunosupprimés et leurs effets secondaires chez l'humain. Les probiotiques qui sont caractérisés selon ces critères sont ensuite soumis à des études cliniques randomisées. Les résultats de ces études doivent démontrer une amélioration de l'état de santé et de la qualité de vie des participants (23).

Les probiotiques regroupent différents types de microorganismes. Actuellement, les microorganismes utilisés sont des bactéries (principalement des bactéries lactiques) mais aussi des levures (Tableau 5). Des recherches constantes visent à identifier des souches avec des propriétés probiotiques et certaines souches inattendues montrent des caractéristiques intéressantes (75).

Microorganismes		**Références**
Bactéries		
genre	espèce	
Bifidobacterium	*breve*	(21, 36)
	infantis	(21, 36)
	lactis	(39)
	longum	(21, 36)
Enterococcus	*faecium*	(79)
	fecalis	(79)
Escherichia	*coli* Nissle 1914	(136, 137, 220)
Lactobacillus	*acidophilus*	(21, 36)
	brevis	(206)
	bulgaricus	(21, 36)
	paracasei	(21, 36)
	plantarum	(21, 36)
	reuteri	(47)
	rhamnosus	(195)
Lactococcus	*lactis*	(81, 252)
Leuconostoc	*mesenteroides*	(173)
Pediococcus	*acidilactici*	(17)
Propionobacterium	*freundenreichii*	(73, 153)
Streptococcus	*thermophilus*	(21, 36)
Weissella	*confusa*	(141, 174)
Levures		
Saccharomyces	*boulardii*	(55, 239)
Kluyveromyces	*lactis*	(131, 138)

Tableau 5 : Exemples de micro-organismes ayant un intérêt probiotique à ce jour

2.6. Modes d'action des probiotiques

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer le mode d'action des probiotiques. Ils sécrètent diverses substances antimicrobiennes telles que des acides organiques, du peroxyde d'hydrogène et des bactériocines. De plus, ils entrent en compétition avec les agents pathogènes pour les sites d'adhésion situés sur les muqueuses. Les probiotiques peuvent également modifier l'environnement où ils se retrouvent en modulant le pH et/ou le potentiel d'oxydo-réduction, ce qui peut compromettre l'établissement de pathogènes. Enfin, les probiotiques peuvent procurer des effets bénéfiques en stimulant l'immunité non spécifique et en modulant la réponse immunitaire humorale et cellulaire.

Il n'est pas rare de trouver des préparations où les souches probiotiques sont associées dans le but d'amplifier ces effets bénéfiques (23, 216).

Meurman a proposé une adaptation de ces différents modes d'action pour les probiotiques destinés à la santé bucco-dentaire (Tableau 6). Le probiotique destiné à un usage buccal doit lui aussi pouvoir à la fois empêcher l'installation et la croissance des microorganismes pathogènes mais aussi stimuler les moyens de défense de l'hôte contre ces mêmes agents pathogènes (23).

Interactions directes des probiotiques au sein de la plaque dentaire	Actions indirectes des probiotiques dans la cavité buccale
• Perturbation de la liaison des microorganismes oraux aux protéines (perturbation de la formation du biofilm) • Action sur la formation de la plaque et sur son écosystème complexe par compétition et par intervention dans les liaisons bactéries-bactéries • Compétition avec les microorganismes oraux pour le métabolisme des substrats disponibles • Production de composés chimiques inhibant les bactéries orales (substances antimicrobiennes)	• Modulation de la fonction immunitaire systémique • Effet sur l'immunité locale • Effet sur les mécanismes de défenses non immunologiques • Régulation de la perméabilité des muqueuses • Pression de sélection sur le développement de la microflore orale à travers la colonisation par des espèces moins pathogènes

Tableau 6 : Mécanismes hypothétiques de l'action des probiotiques dans la cavité buccale selon Meurman (166)

- Impératifs biologiques des probiotiques

Comme nous l'avons précédemment écrit, le probiotique doit posséder certaines propriétés qui lui donnent un avantage sélectif sur des organismes pathogènes. Ces propriétés regroupent des capacités d'adhésion, de production des molécules antibactériennes et de modulation du système immunitaire. Le probiotique doit, de plus, conserver une complète innocuité vis à vis de l'hôte.

2.6.1. Adhésion bactérienne

Il est maintenant reconnu que les bactéries adoptent un mode de vie communautaire et sédentaire au sein d'un biofilm plutôt qu'un développement libre en suspension dans des milieux aqueux (278). Ce mode de vie communautaire a lieu quand les bactéries peuvent adhérer à un support et entre elles. Un phénomène important pour l'étape d'adhésion des bactéries à un support est le conditionnement des surfaces à coloniser. Si on considère la surface d'un matériau solide vierge de tout composé, plongée dans un milieu aqueux, elle va se couvrir, en quelques minutes, des molécules présentes en suspension dans ce milieu. L'adsorption de ces molécules va grandement modifier les propriétés de surface initiales du matériau (33). Il semblerait également que la concentration des molécules à cette interface solide-liquide soit plus élevée que dans le milieu aqueux environnant ce qui multiplierait localement les molécules. Ceci a deux conséquences principales : la concentration de molécules facilitant l'adhésion des bactéries à la surface est augmentée, tout comme le nombre de nutriments, permettant l'amélioration de la croissance des organismes exigeants.

La deuxième étape après le conditionnement de la surface va être le mouvement bactérien vers cette surface. Les bactéries vont alors entrer en contact avec celle-ci par deux moyens :

- des mouvements passifs (diffusion passive avec implication des mouvements browniens, sédimentation ou encore convection)
- ou des mouvements actifs (motilité bactérienne impliquant éventuellement de la chimiotaxie).

Il faut noter que les mouvements passifs de cette phase d'approche sont dépendants de la rhéologie du liquide dans lequel les bactéries sont en suspension. Mais d'autres caractéristiques du milieu aqueux environnant comme le pH, la force ionique ou la température peuvent influer sur la quantité de bactéries s'attachant à la surface.

Après ces 2 étapes préparatoires (conditionnement de la surface et rapprochement de l'organisme), l'adhésion à proprement parlé va se dérouler en 2 phases : une phase réversible

où le microorganisme est faiblement attaché à la surface (car seules des liaisons de faibles énergies sont impliquées) puis une phase dite irréversible où des structures plus spécifiques vont être impliquées (adhésines, exopolysaccharides,...).

De nombreuses théories cherchent à expliquer la phase d'adhésion réversible. La théorie qui semble la plus rigoureuse est la théorie élargie de Derjauin-Landau-Verwey-Overbeek (DVLO) qui prend en compte l'ensemble des forces non spécifiques en présence et notamment les forces d'hydratation négligées par la version classique de la théorie DVLO (236). Parmi ces forces, on peut citer entre autres les interactions électrostatiques et hydrophobes, l'encombrement stérique, les forces hydrodynamiques et de Van der Waals. L'hydrophobicité semble avoir la plus grande influence dans la survenue de l'adhésion primaire car celle-ci a lieu malgré la répulsion due aux interactions électrostatiques (la plupart des bactéries et des surfaces étant de charge négative) (33, 69).

La deuxième phase de l'adhésion est une phase pendant laquelle les liaisons entre le microorganisme et sa surface vont devenir irréversibles c'est-à-dire que le microorganisme ne pourra être enlevé de la surface que par des phénomènes physiques ou chimiques. Lors de cette phase, les adhésines bactériennes se lient à des protéines ou des hydrates de carbone présents sur le film de conditionnement et certaines bactéries ayant adhéré se mettent à synthétiser des exopolysaccharides, tout ceci renforçant l'adhésion. C'est à partir de l'adhésion irréversible que va pouvoir avoir lieu la colonisation de la surface. En effet, elle va permettre la formation d'agrégats cellulaires sur la surface par division des bactéries déjà adhérées mais aussi en facilitant l'adhésion des bactéries planctoniques en suspension dans le milieu, par des phénomènes de coagrégation. Le biofilm va pouvoir arriver à maturation. Cette phase correspond à un équilibre du biofilm. Les relations des bactéries en son sein se complexifient. Des mécanismes de communications cellulaires comme le quorum sensing ou encore des échanges de matériel génétique entre espèces vont se mettre en place. La diffusion des nutriments au sein du biofilm se fait plus difficilement ce qui génère un ralentissement du métabolisme des bactéries les plus proches du support tandis que les bactéries en surface continuent à croître. La stabilité du biofilm va être maintenue par des phénomènes de mort cellulaire et le détachement de certaines cellules qui peuvent, lors de cette phase qu'on appelle la dispersion, revenir à un état planctonique.

2.6.2. Propriétés anti bactériennes

Les bactéries visant à obtenir le statut de probiotiques doivent posséder de nombreuses propriétés dirigées contre la croissance des organismes pathogènes. Différentes molécules antibactériennes sont produites par les probiotiques. Les composés antimicrobiens décrits sont des acides organiques, du peroxyde d'hydrogène et des peptides portant le nom de bactériocines.

Les acides organiques produits notamment lors de la fermentation (essentiellement l'acide lactique et l'acide acétique) semblent jouer un rôle antimicrobien important bien que, pour certains, ils agiraient principalement en perméabilisant la paroi bactérienne permettant le passage d'autres molécules antibactériennes (151, 222, 247).

Les bactériocines sont des protéines ou des complexes de protéines avec une activité bactéricide généralement dirigée contre des espèces proches de la souche productrice. Les variations décrites au niveau des propriétés biochimiques, des poids moléculaires, des spectres et modes d'action a donné lieu à une classification proposée par Klaenhammer (126) :

- La classe I ou lantibiotiques : ce sont des peptides de petites tailles (inférieure à 5kDa), thermostables et qui contiennent des acides aminés soufrés inhabituels ou des groupes déshydratés (lanthionine, déhydroalanine, ...). Ils sont de deux types : la classe Ia qui comprend des peptides cationiques hydrophobes et la classe Ib qui comprend des peptides chargés négativement ou sans charge nette (163, 259). Certains lantibiotiques sont constitués de deux peptides agissant ensemble comme la thermophiline 13 de *Streptococcus thermophilus* (154).
- La classe II : elle comprend des peptides de taille inférieure à 10kDa, thermostables, ne contenant pas d'acides aminés modifiés. La classe II est divisée en trois sous-classes : la sous-classe IIa, la sous-classe IIb et la sous-classe IIc. Les bactériocines de la sous-classe IIa ont toutes une partie N-terminale hydrophobe contenant la séquence consensus YGNGV et possèdent toutes une activité contre *Listeria monocytogenes*. Les bactériocines de la sous-classe IIb ont besoin de deux peptides pour avoir une activité ; le deuxième peptide agit soit en augmentant l'action du premier soit en lui étant complémentaire (synergie). La sous-classe IIc contient toutes les bactériocines ne pouvant être classées dans les autres sous-classes.
- La classe III : qui comprend des protéines de taille supérieure à 30kDa et thermolabiles. Les bactériocines de cette classe agissent en hydrolysant les liens peptidiques des peptidoglycanes des cellules sensibles.

- La classe IV se compose de peptides requérant une partie carbohydratée ou lipidique pour avoir une activité. Aucune bactériocine de cette classe n'a encore été décrite (67).

Les bactériocines sont d'un grand intérêt notamment pour l'industrie agro-industrielle. En effet, la gestion de la contamination des aliments est un défi et dans les stratégies de bioconservation, les probiotiques ont toute leur place. Actuellement, seule la nisine (un lantibiotique largement étudié et produit par *Lactococcus lactis*) est accepté en tant que conservateur comme additif alimentaire sous la référence E234 (67, 91).

2.6.3. Stimulation immunitaire

L'environnement est déterminant pour que certains microorganismes exercent leur activité immogène spécifique ou leurs interactions cellulaires chez un hôte donné (140). Les mécanismes impliqués dans la modulation et la stimulation immunitaire par les probiotiques semblent variés.

Les bactéries probiotiques peuvent moduler les populations cellulaires de l'immunité. Par exemple, certains probiotiques seraient en mesure de faire pencher la balance lymphocytes T helper (LTh) en faveur des lymphocytes Th1 (au détriment des Th2), ce qui aurait un effet positif sur la diminution des réponses allergiques médiées par les Th2 (72).

Les probiotiques agissent également en modulant la production de cytokines. Pathmakanthan et al. ont montré, par exemple, une action sur l'augmentation de la sécrétion de cytokines anti inflammatoires comme IL-10 par des macrophages et les lymphocytes T isolées de la muqueuse d'un colon inflammatoire (189).

Les probiotiques pourraient renforcer la barrière épithéliale via l'amélioration des interactions intercellulaires, ceci a été notamment montré au niveau intestinal (71, 150, 178).

Bien que la définition actuelle retenue pour les probiotiques concerne des organismes vivants, les effets immunomodulateurs bénéfiques sont aussi observés avec des cellules bactériennes mortes (3, 185). Ceci amène à se poser la question des structures bactériennes impliquées dans ces mécanismes d'immunomodulation. De nombreuses études s'y sont intéressées mais aucune réponse définitive n'a été apportée. L'ADN comme de nombreux composants de surface (peptidoglycane, acide lipotéichoïque, exopolysaccharides) ont été évoqués (7, 83, 112). Les exopolysaccharides de surface des lactobacilles ont montré des capacités à moduler la production de cytokines par les macrophages murins (43, 116, 147).

L'effet immunomodulateur pourrait être également induit par la sécrétion de molécules par des probiotiques. *Saccharomyces boulardii* produit une petite molécule antiinflammatoire (de

moins d'1 kDa), thermostable et hydrosoluble. Cette molécule isolée du surnageant de culture fongique est nommée Saccharomyces Anti Inflammatory Factor (SAIF) (231).

2.6.4. Innocuité des souches

Les probiotiques sont des organismes vivants. De ce fait, ils peuvent être responsables théoriquement de plusieurs types d'effets secondaires comme un risque d'infection systémique, un risque d'activités métaboliques délétères, des risques de transfert génétique (213). Les souches utilisées doivent être non pathogènes et peu infectieuses et l'isolement croissant de bactéries lactiques dans des infections cliniques pose la question de leur réelle innocuité (105, 127).

Par exemple, l'utilisation de *Saccharomyces boulardii* comme organisme vivant, expose à des risques d'infection fongique systémique par translocation digestive ou manuportage ; d'ailleurs de rares cas de fongémies ont été observés chez des patients hospitalisés, porteurs d'un cathéter veineux central ou présentant une pathologie sévère, le plus souvent digestive (250).

L'indication d'utilisation des probiotiques doit donc être bien posée et il serait judicieux de limiter leur consommation chez les individus à risque.

2.7.Les probiotiques en santé générale

A l'heure actuelle, les probiotiques sont principalement utilisés pour l'équilibre des tractus gastro-intestinal et vaginal (273). Leur indication dans cette utilisation est plutôt large.

En effet, les probiotiques diminuent la durée et la fréquence des diarrhées infectieuses ou associées aux antibiotiques (60). Il a également été montré qu'ils réduisent l'incidence et la sévérité d'entérocolites nécrosantes chez le nourrisson (78), le risque de cancer colorectal (76), les symptômes associés au syndrome du côlon irritable (9, 159). Bien que ce soit relativement controversé, certaines préparations de probiotiques pourraient même améliorer l'intolérance au lactose (143). Plusieurs études rapportent les effets positifs de l'utilisation de probiotiques dans le traitement de la constipation (47, 261).

Comme on l'a écrit précédemment, les microorganismes les plus utilisés sont essentiellement la levure *Saccharomyces boulardii* ou des bactéries lactiques principalement *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* qui sont largement employés dans l'industrie alimentaire (124).

Par exemple, *Saccharomyces boulardii* est utilisé pour prévenir plusieurs types de diarrhées (principalement les diarrhées associées aux antibiotiques et celles du voyageur (tourista)) ou les infections à *Clostridium difficile* (55, 164). Les mécanismes d'action sont de mieux en

mieux compris (103, 194) même si des études sont encore nécessaires pour définir précisément les indications de l'utilisation de la levure. La définition du cadre d'utilisation de *S. boulardii* s'impose d'une part par le manque d'études cliniques de grande envergure mais aussi d'autre part, vis-à-vis de l'incertitude sanitaire pour les patients à risque comme les immunodéprimés (123, 172, 250).

D'autres levures sont étudiées pour leur potentiel probiotique, et, actuellement la souche la plus prometteuse est *Kluyveromyces lactis*. Elle a en effet montré des propriétés d'immunostimulation et de résistance au passage digestif (résistance à l'acidité, à la bile) qui sont encourageants (131, 138).

E. coli Nissle 1917 a montré, lui aussi, de nombreux effets positifs dans le traitement de certaines affections du tube digestif notamment dans des maladies infectieuses ou inflammatoires comme la maladie de Crohn ou encore des entérites. Il permettrait en plus une amélioration de l'état immunitaire local chez les nouveau-nés et les prématurés (6, 54, 137, 200).

Certaines études, outre les effets positifs dans le traitement des maladies infectieuses, suggèrent que quelques souches permettraient de diminuer la symptomatologie douloureuse associée. Rousseaux et al. ont montré que *L. acidophilus* NCFM a permis l'expression de récepteurs μ-opioïdes et cannabinoïdes chez les cellules épithéliales intestinales, conférant un effet analgésique comparable à celui de la morphine (211).

Il a été montré également que les probiotiques pouvaient agir en apportant des enzymes déficientes chez l'hôte. C'est le cas notamment dans l'amélioration des symptômes de l'intolérance au lactose (disparition des douleurs abdominales et des selles molles) par les probiotiques (85, 125). Elle serait due à l'apport d'une β-galactosidase fonctionnelle par le probiotique (160).

2.8. Les probiotiques en santé bucco-dentaire

Les données concernant le rôle grandissant des probiotiques dans le maintien de la santé bucco-dentaire s'accumulent dans la littérature. En effet, plusieurs études récentes suggèrent que les probiotiques pourraient être également bénéfiques pour la santé bucco-dentaire.

2.8.1. Etudes *in vitro*

De nombreuses espèces (*Lactobacillus, Weisseria, Leuconostoc*, ...) ont montré *in vitro* l'inhibition de la formation du biofilm par *S. mutans* (40, 117, 118). Les mécanismes de cette

inhibition ne sont pas encore clairement élucidés mais la compétition pour l'adhésion semble être un moyen important bien que la production de molécules inhibitrices puisse concourir également à cette limitation de développement du biofilm. Pour exemple, Tong et *al.* ont ainsi montré que *Lactococcus lactis* pouvait avoir *in vitro* une action inhibitrice sur l'adhésion de *S. mutans* et que la nisine produite par cette espèce avait une activité inhibitrice sur certains pathogènes carieux (elle a été efficace sur certaines souches de streptocoques et de lactobacilles mais inefficace sur la souche de *A. viscosus* ATCC 15987) (255, 256).

L'activité des probiotiques pourraient être non seulement appliquée aux pathogènes carieux mais également aux pathogènes parodontaux. Des données récentes rapportent des travaux où des bactéries impliquées dans les maladies parodontales ont été inhibées par des probiotiques (246, 263).

Des études tendent à montrer que l'utilisation préventive des probiotiques peut être également intéressante. Zhu et al. ont montré que des probiotiques contenus dans un yaourt avaient la capacité d'inhiber certains parodontopathogènes *in vitro* et que cette inhibition est d'autant plus importante que les probiotiques ont été inoculés avant les pathogènes (277).

2.8.2. Etudes cliniques

Plusieurs études cliniques ont démontré que la consommation régulière de souches probiotiques (principalement des lactobacilles et des bifidobactéries) contenues ou non dans des produits alimentaires ont diminué le nombre de streptocoques cariogènes dans la salive et la plaque dentaire entraînant un risque significativement plus faible de caries (4, 29, 30, 42).

Näse et al. ont montré au cours d'une étude à long terme (7 mois) que la consommation de lait supplémenté avec une souche de *L. rhamnosus* avait eu un effet bénéfique sur l'incidence carieuse chez des enfants de 1 à 6 ans (l'effet étant particulièrement visible chez des enfants de 3 à 4 ans) (175). Cependant, certaines études montrent que les probiotiques persistent peu dans la cavité orale après l'arrêt de leur prise (ils ne sont donc pas capables de s'établir durablement) et ne sont pas toujours en mesure de réduire significativement le nombre de pathogènes (240).

Plusieurs études ont également révélé que des souches de lactobacilles contenus dans des chewing-gum ou des boissons probiotiques ont pu induire la réduction de l'inflammation gingivale (135, 227, 258), l'amélioration de la santé parodontale (224) et la diminution de la concentration de bacilles Gram négatif à pigmentation noire comme *Porphyromonas gingivalis* dans la salive ou les sites sous-gingivaux (104, 106). Même si des paramètres

cliniques comme le saignement ne sont pas toujours améliorés, Staab et al. ont montré qu'il pouvait y avoir une diminution de l'activité des collagénases et élastases responsables de l'aggravation des lésions dégénératives du parodonte (233).

2.9. Adhésion des lactobacilles

Une condition essentielle pour qu'un microorganisme représente un probiotique d'intérêt pour la santé buccodentaire est sa capacité d'adhérer et de coloniser les diverses surfaces de la cavité buccale (50, 167).

L'étude des composants de la surface des lactobacilles révèle de nombreuses structures pouvant être impliquées dans des mécanismes d'adhésion.

Une liaison des lactobacilles aux mucines a été décrite et de nombreux auteurs ont proposé qu'elle puisse être due à la présence de protéines à la surface des lactobacilles (48, 52, 196, 207). D'autres molécules (fractions saccharidiques, acide lipotéichoïque) ont été évoquées mais elles ne sont pas pour l'instant précisément identifiées (100, 169, 265).

Certaines adhésines ont pourtant été déterminées fonctionnellement. C'est le cas pour la protéine Mub de *L. reuteri* 1063 (207), la protéine Msa de *L. plantarum* WCFS1 (196) et la protéine Mub de *L. acidophilus* NCFM (25). Ces protéines présentent toutes une structure similaire : une extrémité N-terminale (ayant un peptide signal qui cible le transport de la protéine vers la membrane plasmique), une extrémité C-terminale (qui contient un motif LPxTG reconnu par une famille de protéines appelées sortases et qui va permettre l'ancrage de la protéine au peptidoglycane de la paroi bactérienne) et un domaine MUB (pour MUcus Binding) (176, 177, 254, 265). Sur la base des séquences des domaines MUB des protéines Mub de *L. reuteri* 1063 et Msa de *L. plantarum* WCFS1, un modèle a été créé permettant la recherche d'autres protéines présentant d'éventuels domaines MUB dans des bases de données publiques. Boekhorst et al. ont ainsi montré que plusieurs espèces de bactéries lactiques possèdent des protéines ayant au moins un de ces domaines MUB (22).

Des protéines médiant l'adhésion pourraient également se trouver dans la S-layer de certains lactobacilles. En effet, il a été montré que la protéine CbsA de *L. crispatus* JCM 5810 pouvait adhérer aux collagènes, à la laminine et aux acides lipotéichoïques (8, 225) ou encore que la protéine SlpA de *L. brevis* ATCC 8287 adhérait à des lignées cellulaires épithéliales humaines et à la fibronectine (102).

Des structures comme les fimbriae pourraient aussi être impliqués dans ces phénomènes d'adhésion. En effet, des gènes codant pour des fimbriae ont été retrouvés dans le génome de

L. johnsonii NCC533 (197), mais la réelle observation d'un pili n'a été montrée que pour *L. rhamnosus* GG, à ce jour (120).

Outre ces structures, des molécules non protéiques (acides lipotéichoïques, exopolysaccharides de surface) pourraient favoriser les phénomènes d'adhésion (88, 265). Les exopolysaccharides pourraient en outre, permettre comme dans le cas des streptocoques une meilleure adhésion des lactobacilles sur surface dure (34).

2.10. La production des molécules antibactériennes

On reconnaît depuis longtemps aux lactobacilles la capacité de produire des substances antibactériennes tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, du diacétyl, de la reutérine et des protéines antimicrobiennes appelées bactériocines.

Les acides lactique et acétique produits par ces bactéries lors de la fermentation, assurent d'importantes fonctions antimicrobiennes. Ces acides organiques agissent à deux niveaux : d'une part leur pénétration dans le cytoplasme bactérien a une action directe en inhibant les fonctions cellulaires et d'autre part, en condition acide, la compétitivité bactérienne des lactobacilles va se trouver améliorée (propriété acidurique).

Les lactobacilles sont catalase-négatifs et certaines souches peuvent accumuler du peroxyde d'hydrogène. Ce composé est reconnu depuis longtemps comme un agent important de l'activité antibactérienne des lactobacilles (56), bien que certains auteurs considèrent que ce n'est pas le plus important (181). La formation du peroxyde d'hydrogène serait due à la l'action d'oxydases et d'une superoxyde-dismutase (51).

Parmi les autres composés produits par certains lactobacilles et considérés comme ayant une activité antibactérienne, on peut citer également le diacétyl et la reutérine.

Le diacétyl ou 2,3-butanedione est une molécule bien connue pour ses propriétés aromatiques, il donne son goût caractéristique au beurre. Il possède lui aussi une activité antibactérienne même si elle est moindre dans les conditions de fermentations normales (192). En tant que composé antimicrobien, le diacétyl a montré des effets inhibiteurs plus importants sur la croissance des bactéries Gram-négatives que sur celles des bactéries Gram-positives (110).

La reutérine, mis en évidence par Axelsson et al. (11), est un composé dont les propriétés inhibitrices sont bien documentées (11, 41, 46, 232). Cet inhibiteur à large spectre a d'abord été isolé chez *L. reuteri* mais serait aussi produit par d'autres lactobacilles (161). Les essais de caractérisation de la composition de la reutérine ont révélé la présence d'un mélange

de monomère, monomère hydraté et de dimère cyclique de 3-hydroxypropionaldéhyde (3-HPA) (243). L'existence de différentes formes de HPA rend la détermination du mécanisme d'action d'une molécule individuelle très compliquée et le mode d'action n'est pas complètement compris (267). Deux principales hypothèses ont été proposées concernant ce mode d'action (217). La première serait que la fonction aldéhyde de la reutérine soit hautement réactive vis à vis des fonctions thiols et amines primaires et qu'ainsi, la reutérine pourrait inactiver les protéines et autres petites molécules présentant ces fonctions (268). Une deuxième hypothèse serait que le composé dimérique de HPA pourrait interférer avec la ribonucléotide réductase (enzyme universelle impliquée dans la synthèse d'ADN), ceci conduisant à la mort cellulaire (243, 267). Aujourd'hui, le terme de reutérine est utilisé comme synonyme du système HPA (268). La production du 3-HPA est absolument dépendante de la présence d'une enzyme, la glycérol déshydratase, qui comme son nom l'indique entraine une déshydratation du glycérol.

Les lactobacilles sont aussi largement connus pour leur production de bactériocines. Certaines bactériocines produites par les lactobacilles sont résumées dans le tableau 7.

Souches	Bactériocines	Références
L. acidophilus strain M46	acidocine B	(142)
L. johnsonii	lactacine F	(1)
L. salivarius BGHO1	LS1 et LS2	(27, 28)
L. gasseri LA39	gasséricine A	(121)
L. helveticus 481	helvéticine J	(113, 114)
L. salivarius UCC118	Abp118	(201)
L. curvatus LTH1174	curvacine A	(251)
L. brevis SB27	brévicine 27	(19)
L. plantarum A1	plantaricine ASM1	(96)
L. sakei 1	sakacine 1	(87)

Tableau 7 : Exemples de bactériocines décrites chez des lactobacilles

2.11. Stimulation immunitaire

De nombreux effets immunostimulateurs sont attribués à des souches de lactobacilles. Mais pour l'heure, aucun marqueur phénotypique clairement établi ne peut être utilisé pour prédire

les capacités immunomodulatrices des lactobacilles (269). Plusieurs auteurs ont cependant proposé des caractéristiques phénotypiques qui pourraient être impliqués dans la modulation de la réponse immunitaire comme l'adhésion (186), l'hydrophobicité (190), les capacités d'autoaggrégation (269), la présence de certaines protéines de surface comme les protéines de la S-layer (80) ou encore la production d'exopolysaccharides (221). Les effets immunomodulateurs des lactobacilles sont divers, modulation de la sécrétion de cytokines, action sur des cellules immunitaires comme les cellules dendritiques, les macrophages ou encore les lymphocytes T.

2.12. Innocuité des lactobacilles

Les lactobacilles sont des bactéries qui sont globalement considérées comme peu pathogènes
Le secteur des probiotiques se développe beaucoup principalement pour combattre les maladies touchant le tube digestif. Lors de l'ingestion orale de lactobacilles destinés à protéger le tube digestif, ces lactobacilles peuvent adhérer aux surfaces dentaires. Dès lors, il apparaît comme important de connaître la capacité de ces bactéries à produire des acides à partir de sucres couramment retrouvés dans l'alimentation pour éviter tout risque d'effets délétères sur les dents (risque cariogène) (99).
Outre les risques locaux au niveau du site d'ingestion, les lactobacilles malgré leur classification parmi les organismes peu pathogènes ont été impliqués durant ces dernières années dans de nombreuses complications infectieuses. Les endocardites et les bactériémies ont été rapportées comme les pathologies les plus fréquemment associées aux lactobacilles (31, 77, 101, 230, 253, 271, 276). Mais bien d'autres infections ont été décrites comme des cas d'ischémie intestinale avec des issues fatales chez des patients souffrants préalablement d’une pancréatite aigue (20), des abcès du foie (53, 199), des cas de méningites (205, 219) ou encore des cas d'arthrites septiques (35). Dans la plupart des cas, il existait un terrain de pathologie sous-jacente (immunodépression, chirurgie récente, cancer) (101). Les lactobacilles les plus souvent impliquées sont les *L. casei et L. rhamnosus* (31).

3.Matériels et Méthodes

3.1.Souches bactériennes et cultures

Ce travail a été conduit principalement sur des isolats cliniques. Les souches commerciales (souches ATCC ou DSM, souches isolées à partir de probiotiques déjà commercialisés) et les souches déjà décrites dans d'autres études, ont été utilisées comme contrôle. Soixante six souches de lactobacilles isolées de la cavité buccale de patients français et mexicains ont été testées. Ces lactobacilles appartiennent à la collection propre du laboratoire et ils ont pour la plupart été préalablement identifiés par la combinaison de méthodes morphologiques (coloration de Gram et observation au microscope), biochimiques (galeries api® 50CH, BioMérieux) et génétiques.

Différentes méthodes d'identification génétique ont été utilisées suivant l'évolution des techniques de biologie moléculaire au laboratoire:

- une méthode dérivée de l'amplification aléatoire d'ADN polymorphe plus connue sous l'acronyme RAPD (pour Random Amplification of Polymorphic DNA) (202)
- une méthode d'analyse par électrophorèse sur gel en gradient dénaturant à partir de l'amplification du gène rpoβ par réaction de polymérisation en chaine (82, 168)
- le séquençage de l'ADNr 16S en utilisant des amorces déjà décrites dans la littérature (272).

L'ensemble des lactobacilles sauvages utilisés lors de notre étude sont rassemblés dans le tableau 1 et les lactobacilles commerciaux utilisés comme souches de comparaison sont recensées dans le tableau 2. La composition et la provenance des milieux et géloses utilisés dans cette étude sont détaillées en annexe 1.

Quatre pathogènes buccaux ont été testés : *Streptococcus mutans* ATCC25175, *Actinomyces viscosus* ATCC15987, *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277 et *Fusobacterium nucleatum* ATCC1095. *Streptococcus* et *Actinomyces* ont été mis en culture dans du milieu Tryptone-Soja (TS). *Porphyromonas* et *Fusobacterium* ont été cultivés en milieu Wilkins-Chalgren Anaerobe (WCA).

1002 (*L. paracasei*)	51A (*L. paracasei*)
101A (*L. gasseri*)	52B (*L. paracasei*)
21B (*L. brevis*)	53A (*L. paracasei*)
21C (*L. brevis*)	54A (*L. paracasei*)
21D (*L. acidophilus*)	55A (*L. brevis*)
22A (*L. brevis*)	56A (*L. brevis*)
22B (*L. rhamnosus*)	$57A_1$ (*L. brevis*)
23A (*L. brevis*)	70A (*L. gasseri*)
23B (*L. brevis*)	78A (*L. gasseri*)
23C (*L. rhamnosus*)	A20 (*L. acidophilus*)
24A (*L. rhamnosus*)	A21 (*L. paracasei*)
24B (*L. rhamnosus*)	A22 (*L. paracasei*)
25A (*L. rhamnosus*)	A23 (*L. paracasei*)
27C (*L. rhamnosus*)	A24 (*L. paracasei*)
28A (*L. rhamnosus*)	B2 (*L. brevis*)
29A (*L. rhamnosus*)	B21 (*L. acidophilus*)
301 (*L. paracasei*)	B22 (*L. brevis*)
302 (*L. paracasei*)	BAP3 (*L. rhamnosus*)
31A (*L. brevis*)	BMS1 (*L. plantarum*)
32A (*L. brevis*)	BMS2 (*L. plantarum*)
33A (*L. rhamnosus*)	BRS1 (*L. rhamnosus*)
34A (*L. rhamnosus*)	C4 (*L. acidophilus*)
35A (*L. rhamnosus*)	CJS1 (*L. paracasei*)
36B (*L. plantarum*)	GVD_1 (*L. paracasei*)
37A (*L. rhamnosus*)	GVD_2 (*L. paracasei*)
38A (*L. rhamnosus*)	GVD_3 (*L. rhamnosus*)
40A (*L. paracasei*)	GVD_4 (*L. casei)*
41A (*L. paracasei*)	GVD_5 (*L. paracasei*)
42A (*L. rhamnosus*)	GVS_2 (*L. gasseri*)
45A (*L. rhamnosus*)	GVS_3 (*L. rhamnosus*)
46A (*L. rhamnosus*)	HFS_1 (*L. rhamnosus*)
47A (*L. acidophilus*)	RZD_1 (*L. rhamnosus*)
48A (*L. brevis*)	RZD_2 (*L. paracasei*)

Tableau 8: Soixante six lactobacilles testés appartenant à la collection propre du laboratoire de microbiologie de l'UFR d'Odontologie de l'Université Bordeaux Segalen

Cadre de leur utilisation	Lactobacilles commerciaux utilisés	Groupe fermentaire
Souches de comparaison dans le test d'adhérence sur tube de verre uniquement	*L. casei* ATCC 393 *L. plantarum* ATCC 8014 *L. rhamnosus* ATCC 7469	II II II
Souches de comparaison dans le test d'adhérence sur tube de verre et la méthode MATS	*L. brevis* ATCC 14869 *L. buchneri* ATCC 11305 *L. fermentum* ATCC 9338 *L. acidophilus* CL1285® *L. casei* LBC80R®	III III III I II
Témoins positifs du gène de la glycosyltransférase	*L. gasseri* DSM 20077 *L. gasseri* DSM 20604	I I
Témoin positif pour le gène de la gassericine A	*L. gasseri* LA39	I
Témoin positif du gène de la glycérol déshydratase	*L. collinoides* IOEB 9527	III

Tableau 9 : Lactobacilles du commerce utilisés dans notre étude

3.2. Evaluation des propriétés d'adhérence des lactobacilles

Comme il l'a été montré dans la première partie de ce travail, l'évaluation de l'adhérence de nos souches est une étape indispensable. Trois méthodes différentes ont été utilisées durant cette étude.

3.2.1. Adhérence sur tube de verre

La méthode d'adhérence sur tube de verre a été utilisée pour évaluer l'adhésion sur tissus durs de nos souches; une adhésion importante peut être corrélée à la production d'exopolysaccharides de surface (93, 170).

Dans un tube de verre contenant 10mL de MRS additionné de 1% de saccharose (poids/volume), 500 µL d'une culture overnight du lactobacille à tester (DO_{650nm} = 0.1) est ajoutée. La culture est incubée à 37°C avec une inclinaison de 30°. La formation du biofilm est évaluée à 24 heures puis à 48 heures, selon une échelle établie par Murchison et *al*. (171) ; les valeurs de cette échelle s'étendent de 0 (aucune adhérence) à 4 (fortement adhérent).

3.2.2. Adhésion sur disque d'hydroxyapatite

Cette méthode permet d'évaluer la croissance et l'adhésion des lactobacilles sur des disques d'hydroxyapatite recouvert d'un film salivaire (90, 183).

La première étape de cette méthode consiste à récolter de la salive chez des individus sains après avoir recueilli leur consentement. La salive est collectée sans stimulation chez des volontaires au moins 1h30 après qu'ils aient mangé, bu ou se soient brossé les dents. Les différents échantillons de salive recueillis sont mélangés, centrifugés (30min, 4°C, 15000rpm) et le surnageant est pasteurisé (30 min, 65°C) puis à nouveau centrifugé. Ce surnageant est réparti en tubes de 50 ml et stocké à -20°C. L'efficacité de la pasteurisation est vérifiée par absence de développement de CFU après 72h d'incubation à 37°C (culture aérobie et anaérobie) d'un étalement d'échantillon de salive sur géloses au sang.

- Souche bactérienne et préparation de l'inoculum

Le but est la mise en place et le développement d'un biofilm monoespèce d'une souche de lactobacille adhérent sur disque d'hydroxyapatite. Le lactobacille, initialement en culture dans du MRS, est inoculé dans 10 mL de milieu de culture universel FUM ; il est ensuite placé en incubation en anaérobiose à 37°C pendant 24h. La culture est alors ajustée à DO_{550nm} 1.0.

- Support du biofilm

Le biofilm se développe sur des disques d'hydroxyapatite (diamètre 10mm, épaisseur 1.5 mm, Clarkson Chromatography Products Inc, USA) autoclavés (20min, 120°C).

- Préparation des biofilms

Formation de la pellicule acquise à la surface des disques

Chaque disque est placé dans une boite de culture stérile de 24 puits et mis en incubation avec la salive pasteurisée pendant 4h sous agitation douce à température ambiante.

Ensemencement des disques

La salive est ensuite aspirée de chaque puits et remplacée par un mélange contenant : 800µl de salive + 800µl de FUM contenant 0.15% de glucose et 0.15% de saccharose + 200µl de la suspension bactérienne.

- Analyse des biofilms : grattage et étalement sur géloses MRS

Les disques d'hydroxyapatite sont prélevés des puits et analysés après une durée totale de formation du biofilm de 64h. Les disques sont lavés avec une solution de sérum physiologique

pour éliminer les bactéries non adhérentes. Chaque disque est ensuite placé dans une boite de pétri stérile et la surface du disque est grattée avec une curette stérile (instrument de parodontologie). La surface du disque gratté ainsi que la boîte de Pétri sont rincées avec du sérum physiologique (volume de rinçage final 1 mL) et la suspension cellulaire est vortexée.
50 µl de la suspension diluée à 10^{-4}sont étalées sur gélose MRS. Le nombre de colonies est évalué après 24h d'incubation à 37°c en anaérobiose.

3.2.3. Méthode MATS

La méthode MATS (18) a été utilisée ici pour l'exploration de l'hydrophobicité de surface dont l' importance a déjà évoquée dans le chapitre sur l'adhérence bactérienne.
Une suspension de 10 mL de lactobacilles est centrifugée à 8400g pendant 15 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot resuspendu dans du tampon phosphate de potassium (0.01M, pH=7). Le culot est ainsi lavé deux fois à 8400g pendant 15 minutes et à nouveau resuspendu dans du tampon phosphate. La densité optique de la suspension obtenue est mesurée pour une longueur d'onde de 400nm. Un mL du solvant (polaire ou apolaire) est alors ajouté à 6 mL de la suspension bactérienne et le mélange obtenu est vortexé pendant 90 s. La complète séparation des 2 phases est attendue (environ 15 min). Un échantillon de 5mL de la phase aqueuse est prélevé et sa densité optique mesurée DO_{400nm} (A_1).
L'hydrophobicité est mesurée selon la formule : $(1- A_1/A_0) * 100$

3.3.Evaluation de l'activité antibactérienne

Les limites de certaines méthodes à montrer le caractère inhibiteur des candidats probiotiques vis à vis de certains pathogènes oraux nous ont conduits à utiliser trois méthodes différentes.

3.3.1. Méthode de type antibiogramme

La méthode de type antibiogramme utilisée pour évaluer l'activité antibactérienne de nos lactobacilles est directement inspirée de celle utilisée par Testa (248).
Le milieu de culture des lactobacilles utilisé ici est le bouillon LAPTg préconisé par Testa et al. et mis au point part Raibaud et al. (198). Selon certains auteurs, sous certaines conditions de pH et de température, ce milieu permettrait une meilleure croissance des lactobacilles qu'en bouillon MRS (115).
Les souches de lactobacilles ont été remises en culture trois fois toutes les 24 heures en bouillon LAPTg et incubées à 37°C. A partir de la dernière culture, une suspension

bactérienne de 7mL est obtenue ; sa densité optique est calibrée à DO_{650nm} = 1 ± 0.05. Cette suspension bactérienne est centrifugée à 10000g pendant 15 min à une température de 4°C. Le surnageant est alors séparé du culot et filtré à l'aide d'un filtre Millipore de 0.22µm ceci afin d'éliminer toute éventuelle cellule bactérienne persistante dans le surnageant. Le culot est remis en suspension dans 0.5 ml de solution saline (0.9% NaCl). Des disques papiers sont imbibés soit avec le surnageant filtré soit avec la suspension de culot en solution saline. Ils sont ensuite déposés au nombre de trois sur une gélose Schaedler supplémentée avec 5% de sang de mouton (BioMérieux) qui a été préalablement ensemencée avec 200 µl d'une suspension bactérienne de densité optique DO_{650nm} = 1± 0.05 soit de *Fusobacterium nucleatum* soit de *Porphyromonas gingivalis*. Les géloses sont laissées à incuber à 37°C en anaérobiose (Genbox Anaer, BioMérieux). La lecture des diamètres d'inhibition se fait à 48h.

3.3.2. Méthode de co-culture bactérienne en milieu liquide

Cette méthode antibactérienne est basée sur la compétition et l'inhibition de croissance d'une souche bactérienne sur une autre lorsque celles-ci sont placées ensemble dans le même milieu de culture. Elle a été adaptée à partir d'une technique développée par Salvesen (214).

L'évaluation d'une inhibition de croissance se déroule entre la souche de lactobacille à tester et un des pathogènes *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinomyces viscosus* ou *Streptococcus mutans*. Toutes les souches sont initialement cultivées (24h) dans leur milieu de prédilection (milieu MRS pour les lactobacilles, milieu TS pour *S. mutans* et *A. viscosus* et milieu WCA pour *F. nucleatum*, *P. gingivalis*) puis remis en culture dans du FUM (additionné de 300 µl de sérum de cheval pour les 2 pathogènes aux exigences nutritionnelles plus difficiles). Après une croissance overnight, la densité optique des suspensions bactériennes (lactobacille et des pathogènes) est calibrée à DO_{550nm} = 1 ± 0.05. 500µl de la suspension de lactobacilles et 500 µl de la suspension d'un des pathogènes sont alors mélangés dans un tube de 10 mL de FUM additionné de 300 µl de sérum de cheval. Ce mélange est incubé à 37°C en anaérobiose pendant 24h. Après homogénéisation, 100µl sont prélevés.

Pour permettre une lisibilité suffisante de la culture, avant étalement, le prélèvement destiné à être ensemencé sur gélose MRS est dilué 10^6 fois et celui destiné à être ensemencé sur gélose au sang ou gélose WCA dilué 10^4 fois. Après 24 à 48h de croissance à 37°C en anaérobiose, le nombre de colonies sur chaque gélose est compté. Ce nombre est comparé aux nombres de

colonies obtenus pour une souche de lactobacilles ou d'un des pathogènes qui aurait été cultivée en culture pure dans les mêmes conditions de croissance et d'étalement (témoins).

3.3.3. Méthode d'inhibition bactérienne en gélose superposée (double gélose)

Cette méthode a été initialement décrite par Fleming (74). Pour les besoins de notre étude, elle a été légèrement modifiée pour permettre la croissance des différentes bactéries utilisées.

L'activité antibactérienne des lactobacilles est évaluée contre *S. mutans*, *A. viscosus, F. nucleatum* et *P. gingivalis*. Les lactobacilles sont mis en culture dans du MRS et les pathogènes sont eux aussi initialement cultivés dans un de leur milieu de prédilection (milieu TS pour *S. mutans* et *A. viscosus* et milieu WCA pour *F. nucleatum* et *P. gingivalis*).

Schématiquement, trois spots de 2µL de la suspension de lactobacilles à tester (provenant d'une culture overnight et préalablement ajustée à une densité optique de $DO_{550nm} = 1 \pm 0.05$) sont déposés à la surface d'une gélose MRS. Pour permettre le développement de colonies visibles macroscopiquement, les géloses sont incubées pendant 24h à 37°C en anaérobiose. Les géloses sont ensuite recouvertes avec 7mL de gélose molle (7g/L d'agar) Coeur-Cervelle (qui avait préalablement été ensemencée avec 0.1ml de la suspension bactérienne du pathogène à tester (calibrée à la densité optique de $DO_{550nm} = 1 \pm 0.05$ à partir d'une culture overnight). L'incubation se fait à 37°C en anaérobiose pendant 48h. Une zone claire autour du spot de lactobacilles est considérée comme une inhibition positive. Le diamètre d'inhibition est alors mesuré pour chaque spot. Chaque expérience est conduite trois fois et la moyenne des diamètres d'inhibition est calculée.

De plus, dans le but de vérifier que l'effet antibactérien est de nature protéique, un traitement avec une protéase est évalué. 5 µl d'une solution de protéinase K (0.2mg/mL, Sigma-Aldrich) est mise sur chaque spot après leur croissance de 24h puis après une heure d'action de la protéase, la gélose molle ensemencée est versée comme décrit précédemment.

Remarque : Pour les bactéries anaérobies strictes testées (*F. nucleatum* et *P. gingivalis*), la gélose molle (7g/L d'agar) Coeur-Cervelle a été légèrement modifiée en ajoutant 10mg/L d'hémine, 1mg/L de ménadione et 5g/L d'extrait de levure à la composition de base.

3.3.4. Méthode colorimétrique d'évaluation de la production de peroxyde d'hydrogène

La recherche de la production de peroxyde d'hydrogène chez nos lactobacilles a été faite selon la méthode colorimétrique initialement décrite par Eschenbach et al. et légèrement modifiée par Kang et al. (70, 119). La suspension de lactobacilles à tester a été étalée sur une gélose MRS supplémentée avec 0.25mg/mL de 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) (Sigma Aldrich) et 0.01mg/mL de peroxydase (Sigma Aldrich), et a été incubée en anaérobiose pendant 48h. Les géloses ont ensuite été exposées à l'air ambiant. Les colonies ayant montré une couleur bleue ont été considérés comme productrices de peroxyde d'hydrogène.

3.3.5. Essai d'extraction de bactériocine : utilisation d'une souche productrice connue (*L. gasseri* LA39)

Pour mettre au point, une méthode d'isolement rapide reproductible de bactériocine, nous avons tenté d'isoler la gasséricine A (bactériocine de *L. gasseri* LA39).

Pour cela, la souche LA39 est préalablement mise en culture dans un litre de MRS additionné de 10g/L de peptone pendant 64h à 37°C. L'adjonction de peptone dans le milieu de culture d'une souche productrice d'une bactériocine favoriserait sa production (67). Le temps de culture important a permis d'une part au faible inoculum initial de croître suffisamment et d'autre part la décantation des cellules bactériennes. Le surnageant est filtré à l'aide de filtres Millipore de 0.22µm. Le filtrat obtenu, débarrassé des cellules bactériennes et dénommé extrait brut, est divisé en plusieurs échantillons. Un des échantillons est conservé sans aucun traitement et son pouvoir inhibiteur contre la bactérie sensible à la gasséricine A est testé. Un autre échantillon est ultrafiltré à 30kDa à l'aide du filtre à centrifuger Centriprep 30® (Millipore) à la vitesse de 5000 rpm (rotor SS34, Sorvall RC-5B) pendant 10 minutes. Le filtrat contient toutes les protéines de poids moléculaire inférieur à 30kDa et le concentrât contient celles dont le poids moléculaire est supérieur à 30 kDa. Un troisième échantillon de l'extrait brut est traité par ajustement à 50% de sulfate d'ammonium, cet échantillon est centrifugé (5000 rpm, rotor SS34, Sorvall RC-5B) pendant 10 minutes et le surnageant (que l'on nomme S50) est séparé du culot (que l'on nomme C50). S50 est ajusté à 100% de sulfate d'ammonium puis est centrifugé (5000 rpm, rotor SS34, Sorvall RC-5B) pendant 10 minutes et le nouveau surnageant obtenu (nommé S100) est séparé du culot (que l'on nomme C100). On obtient ainsi six échantillons différents : l'extrait brut, le filtrat 30kD, le concentrât 30kD, la fraction C50, la fraction C100 et le surnageant S100.

Pour éliminer les sels, chaque échantillon est séparé en deux, puis chaque sous partie des échantillons est dialysée. Une partie est dialysée à l'aide d'une membrane de dialyse de limite d'exclusion 3500 Da (Cell Sep®, Fisher) (traitement A) et l'autre à l'aide d'une membrane de dialyse de limite d'exclusion 2000 Da (Cell Sep®, Fisher) (traitement B), tout ceci dans 2 litres de tampon PBS (pH 7, 0.01M) pendant 24h. Dans les deux cas, l'intégralité du tampon est renouvelée au bout de 2 heures puis au bout de 4 heures. Les 12 échantillons (6 obtenus avec le traitement A et 6 avec le traitement B) sont ensuite testés pour vérifier leur capacité à inhiber *Streptococcus mutans* ATCC25175 et *Actinomyces viscosus* ATCC15987 grâce à une méthode de type antibiogramme (utilisation de disques papiers imbibés des différents échantillons).

Une électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS-PAGE) permettant la séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire est réalisée avec l'ensemble de nos échantillons. Les protéines sont séparées selon la méthode initialement décrite par Laemmli (139), dans laquelle un gel d'alignement précède un gel de séparation. Le protocole complet et les tampons utilisés pour l'électrophorèse sont détaillés en annexe 3 et 4. La visualisation des protéines est permise par coloration du gel ; il est placé 1h dans une solution déjà prête à l'emploi (EZ Blue® gel staining reagent, Sigma-Aldrich). Ceci nous permet de vérifier la présence de notre protéine d'intérêt dans un échantillon qui a une activité inhibitrice ou de montrer qu'elle est inactivée mais présente.

3.3.6. Evaluation de l'effet inhibiteur de l'acide lactique sur nos bactéries pathogènes

Des disques imbibés avec des concentrations croissantes d'acide lactique (20, 30, 40 et 50g/L) sont mis sur des géloses dont la surface a été préalablement ensemencée avec 200 µl d'une suspension bactérienne de densité optique DO_{650nm} = 1± 0.05 d'un de nos quatre pathogènes à tester. *S. mutans* ATCC25175 et *A. viscosus* ATCC15987 sont mis en culture sur gélose au sang et, *P. gingivalis* ATCC33277 et *F. nucleatum* ATCC1095 sont cultivés sur gélose WCA. L'expérience est reproduite en triplicata. Les diamètres d'inhibition obtenus sont mesurés et les résultats sont notés sous forme de moyenne.

3.4. Recherche des déterminants génétiques ayant une expression phénotypique potentiellement probiotique

La recherche des déterminants génétiques est faite à partir de l'ADN de nos souches de lactobacilles. L'ADN des 66 souches sauvages ainsi que celui des témoins est extrait à l'aide du GenElute™ Bacterial Genomic DNA kit (Sigma-Aldrich) selon les recommandations du fabricant. Toutes les réactions de PCR sont réalisées à l'aide du même thermocycleur (Minicycler, MJ Research). Les différentes conditions de PCR sont résumées en annexe 2. L'extraction de l'ADN à partir des gels d'agarose (tampon TAE) est réalisée (lorsque cela s'avère utile) à l'aide du kit de purification de gel SNAP™ (Invitrogen) selon les recommandations du fabricant. Le séquençage des produits de PCR d'intérêt est confié à un prestataire extérieur, Beckman Coulters Genomics. Les séquences obtenues sont séquencées puis alignées dans Bioedit®, un éditeur d'alignement de séquences afin de vérifier l'absence d'incorporation d'erreurs lors du séquençage. Après correction, celles-ci sont comparées aux séquences disponibles sur GenBank à l'aide du logiciel BLAST N version 2.2.6 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) à la recherche d'homologie. Les séquences d'intérêt sont ensuite déposées sur GenBank à l'aide de l'outil de soumission BankIt (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/?tool=genbank).

3.4.1. Recherche du gène de la gassericine A chez nos souches identifiées comme *L. gasseri*

Les amorces utilisées (nommées gaaFor et gaaRev) ont été dessinées à partir de la séquence de la gasséricine A publiée par Kawai et al. disponible sur Genbank (numéro d'accès AB007043) (122). Ces amorces ont été élaborées à l'aide du logiciel en ligne Primer3plus (260) (voir annexe 5). Ces amorces permettent d'obtenir un produit de PCR d'une longueur attendue de 384 pb. La vérification des produits de PCR a été réalisée par migration électrophorétique sur gel d'agarose 1% (tampon TBE). L'utilisation d'un marqueur de poids moléculaire (200pb DNA Ladder®, 200bp à 2kb, Jena Bioscience) permet de vérifier la taille des produits de PCR obtenus.

3.4.2. Recherche du gène de la glycérol déshydratase

Les amorces GD1 et GD2 publiées par Claisse et Lonvaud sont utilisées pour la recherche du gène de la glycérol déshydratase chez l'ensemble de nos souches (45). Ces amorces

dégénérées dessinées à partir d'une séquence nucléotidique conservée du gène permettent d'obtenir un produit de PCR d'une longueur attendue de 275 pb. La vérification des produits de PCR a été réalisée par migration électrophorétique sur gel d'agarose 1% (tampon TBE). L'utilisation d'un marqueur de poids moléculaire (200pb DNA Ladder®, 200bp à 2kb, Jena Bioscience) permet de vérifier la taille des produits de PCR obtenus.

3.4.3. Recherche de gènes codant pour des glucosyltransférases (GTFs)

La recherche de glucosyltransférases a été conduite avec des amorces déjà décrites dans la littérature. L'amorce dégénérée DegFor a été utilisée en combinaison avec l'amorce classique GTFI-R. L'amorce DegFor décrite par Kralj et al. a été dessinée à partir du domaine catalytique de dix glucosyltransférases issues de 8 souches différentes de lactobacilles (5 de *L. reuteri*, 1 de *L. fermentum*, 1 de *L. sakei* et 1 de *L. parabuchneri*) (134). L'amorce GTFI-R a été dessinée à partir de la glucosyltransférase de *S. sobrinus* (182), elle a été choisie pour sa grande homologie avec l'amorce DegRev (dessinée par Kralj et al.) et pour sa plus grande stabilité.

3.5. Mesure de l'activité fermentaire des lactobacilles

L'activité fermentaire des lactobacilles a été étudiée en s'inspirant d'une méthode initialement décrite par Haukioja et al. (97) dans un milieu particulier dépourvu de sucres mais autorisant la croissance bactérienne. Ce milieu dénommé Fermentation Minimal Medium (FMM) autorise, quand on lui rajoute l'ose ou le polyol que l'on veut tester, d'apprécier les capacités fermentaires d'une bactérie pour ce sucre donné (58). Nous avons choisi de tester trois sucres couramment retrouvées dans l'alimentation (saccharose, glucose et fructose) ainsi qu'un polyol utilisé dans le cadre de la prévention de la maladie carieuse, le xylitol.

Après croissance overnight dans du milieu MRS des souches de lactobacilles testées, la culture bactérienne est centrifugée à 2000g pendant 10 min. Le surnageant est alors éliminé et le culot resuspendu dans du FMM. La suspension bactérienne ainsi obtenue est de nouveau centrifugée à 2000g pendant dix minutes. Cette opération répétée deux fois est appelée lavage. Après le deuxième lavage, le culot est encore une fois remis en suspension et la densité optique de cette suspension est ajustée à la valeur de 1 pour une longueur d'onde de 650 nm.

Pour éliminer la production d'acides à partir des réserves en glucose de la bactérie, une déplétion de ces réserves est effectuée en pré incubant les bactéries à 37°C pendant vingt minutes. 1 mL de suspension bactérienne est introduit dans 10mL de milieu FMM contenant

le sucre testé à la concentration de 100mM. L'évaluation de la consommation de sucre est permise en réalisant un suivi de l'évolution de pH à 5 min, 10 min, 15 min, 30 min à l'aide d'un pHmètre (InoLab pH Level 2 P, WTW GmbH).

4. Résultats

Notre travail a porté sur soixante six isolats cliniques de lactobacilles que nos méthodes d'identification nous ont permis de regrouper en 7 espèces distinctes, chaque groupe fermentaire des lactobacilles étant représenté (Tableau 10).

	Groupe fermentaire	Nombre de souches	Pourcentage de souches
L. acidophilus	I	5	8%
L. gasseri	I	4	6%
L. casei	II	1	2%
L. paracasei	II	18	27%
L. plantarum	II	3	5%
L. rhamnosus	II	22	33%
L. brevis	III	13	19%

Tableau 10 : Espèces de lactobacilles retrouvées dans notre étude

4.1.Evaluation des propriétés d'adhérence des lactobacilles

Les propriétés d'adhérence des lactobacilles ont été évaluées *in vitr*o selon 3 méthodes : la méthode d'adhérence sur tube de verre, la méthode MATS et une méthode d'adhésion sur disque d'hydroxyapatite recouvert de salive.

Remarque : les tests d'adhérence ont tous été fait en triplicata, les résultats reportés ici sont une moyenne.

Les résultats de l'adhérence sur tube de verre recueillis à 48h sont résumés dans le Tableau 11. Seulement 10 isolats cliniques ont montré des scores d'adhésion sur tube de verre supérieur ou égal à 3 selon l'échelle visuelle de Murchison (Figure 2). Ces isolats cliniques ont ensuite été testés pour leur hydrophobicité de surface et leur caractère accepteur ou donneur d'électron (acide ou base de Lewis) selon la méthode MATS. Les résultats de cette évaluation sont regroupés dans le Tableau 12 et comparés aux résultats obtenus pour les trois souches ATCC de lactobacilles ayant obtenus les meilleurs scores d'adhérence sur tube de verre et ceux obtenus par les lactobacilles du probiotique BioK+® (*L. acidophilus* CL1285® et *L. casei* LBC80R®).

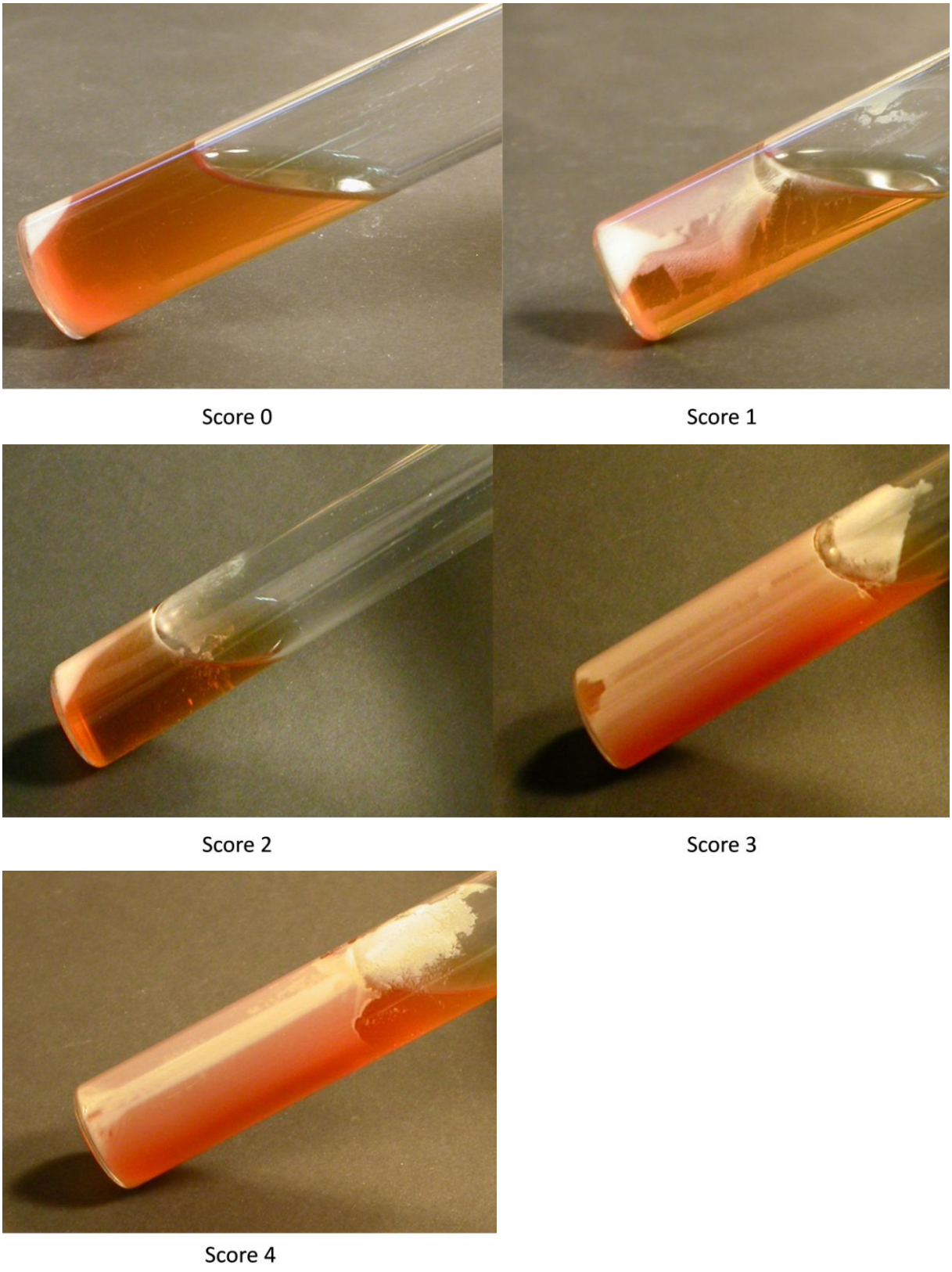


Figure 2 : Adhérence sur tube de verre (échelle visuelle, classification de Murchison)

	Score 48h		Score 48h
L. rhamnosus ATCC 7469	0	*L. casei* LBC80R®	1
L. casei ATCC 393	0	BMS1 (*L. plantarum*)	0
L. plantarum ATCC 8014	0	GVD1 (*L. paracasei*)	0
L. brevis ATCC 14869	4	A20 (*L. acidophilus*)	0
L. fermentum ATCC 9338	3	A21 (*L. paracasei*)	0
L. buchneri ATCC 11305	3	A22 (*L. paracasei*)	0
BAP3 (*L. rhamnosus*)	3	A23 (*L. paracasei*)	0
BMS2 (*L. plantarum*)	3	C4 (*L. acidophilus*)	0
CJS1 (*L. paracasei*)	3	21C (*L. brevis*)	0
22A (*L. brevis*)	3	21D (*L. acidophilus*)	0
22B (*L. rhamnosus*)	3	27A (*L. rhamnosus*)	0
24B (*L. rhamnosus*)	3	29A (*L. rhamnosus*)	0
70A (*L. gasseri*)	3	32A (*L. brevis*)	0
78A (*L. gasseri*)	3	36B (*L. plantarum*)	0
101A (*L. gasseri*)	3	37A (*L. rhamnosus*)	0
GVS_2 (*L. gasseri*)	3	38A (*L. rhamnosus*)	0
A24 (*L. paracasei*)	2	40A (*L. paracasei*)	0
L. acidophilus CL1285®	2	41A (*L. paracasei*)	0
BRS1 (*L. rhamnosus*)	1	42A (*L. rhamnosus*)	0
B2 (*L. brevis*)	1	45A (*L. rhamnosus*)	0
B21 (*L. acidophilus*)	1	46A (*L. rhamnosus*)	0
B22 (*L. brevis*)	1	47A (*L. acidophilus*)	0
21B (*L. brevis*)	1	48A (*L. brevis*)	0
23A (*L. brevis*)	1	51A (*L. paracasei*)	0
23B (*L. brevis*)	1	52B (*L. paracasei*)	0
23C (*L. rhamnosus*)	1	53A (*L. paracasei*)	0
24A (*L. rhamnosus*)	1	54A (*L. paracasei*)	0
25A (*L. rhamnosus*)	1	55A (*L. brevis*)	0
28A (*L. rhamnosus*)	1	56A (*L. brevis*)	0
31A (*L. brevis*)	1	$57A_1$ (*L. brevis*)	0
33A (*L. rhamnosus*)	1	301 (*L. paracasei*)	0
34A (*L. rhamnosus*)	1	302 (*L. paracasei*)	0
35A (*L. rhamnosus*)	1	1002 (*L. paracasei*)	0
GVS_3 (*L. rhamnosus*)	1	GVD2 (*L. paracasei*)	0
HFS_1 (*L. rhamnosus*)	1	GVD3 (*L. rhamnosus*)	0
RZD_1 (*L. rhamnosus*)	1	GVD_4 (*L. casei*)	0
RZD_2 (*L. paracasei*)	1	GVD5 (*L. paracasei*)	0

0: absence de biofilm
1: biofilm non-adhérent
2: biofilm faiblement adhérent
3: biofilm adhérent
4: biofilm fortement adhérent

Tableau 11 : Résultats des tests d'adhérence sur tube de verre

Souches	Solvant	Hydrophobicité		Groupe d'hydrophobicité
		Moyenne	Ecart-type	
L. brevis ATCC 14869	Hexadécane	**5.66**	2.21	
	Chloroforme	**21.93**	1.37	
L. buchneri ATCC 11305	Hexadécane	**0.1**	0.30	
	Chloroforme	**0.36**	0.56	
L. fermentum ATCC 9338	Hexadécane	**0.33**	0.30	
	Chloroforme	**2.52**	0.56	
L. acidophilus CL1285®	Hexadécane	**6.96**	0.15	
	Chloroforme	**6.33**	0.70	
L. casei LBC80R®	Hexadécane	**32,13**	2.55	
	Chloroforme	**66.64**	8.22	
101A (*L. gasseri*)	Hexadécane	**18.35**	5.09	
	Chloroforme	**38.95**	11.12	Hydrophobicité faible
22A (*L. brevis*)	Hexadécane	**4.88**	2.15	
	Chloroforme	**7.63**	3.10	
22B (*L. rhamnosus*)	Hexadécane	**1.34**	0.56	
	Chloroforme	**0.78**	0.27	
A24 (*L. paracasei*)	Hexadécane	**13.82**	2.15	
	Chloroforme	**29.72**	9.39	
BAP3 (*L. rhamnosus*)	Hexadécane	**15.3**	1.14	
	Chloroforme	**29.46**	5.46	
BMS2 (*L. plantarum*)	Hexadécane	**1.50**	0.69	
	Chloroforme	**14.33**	5.70	
CJS1 (*L. paracasei*)	Hexadécane	**4.06**	0.50	
	Chloroforme	**19.42**	3.73	
70A (*L. gasseri*)	Hexadécane	**45.73**	20.40	
	Chloroforme	**52.83**	7.22	
78A (*L. gasseri*)	Hexadécane	**49.53**	4.98	Hydrophobicité moyenne
	Chloroforme	**66.69**	3.59	
GVS2 (*L. gasseri*)	Hexadécane	**52.67**	13.81	
	Chloroforme	**85.47**	11.66	

Tableau 12 : Mesure de l'hydrophobicité de surface des 10 souches adhérentes sur tube de verre
(Comparaison avec les 3 souches ATCC les plus adhérentes et deux souches du produit probiotique BioK+ Rx CL1285®)

Les 10 souches d'intérêt ont également été testées pour leur adhérence sur un système mimant la situation *in vivo*, un disque d'hydroxyapatite recouvert d'un film salivaire. Les résultats sont notés sous la forme du logarithme décimal du nombre de CFU/mm^2 dans le Tableau 13. Les souches sélectionnées ont toutes montré une capacité d'adhérence au support.

Souches	Log_{10} CFU / mm^2
L. brevis ATCC 14869	3.16
L. buchneri ATCC 11305	3.81
L. fermentum ATCC 9338	2.83
101A (*L. gasseri*)	2.53
22A (*L. brevis*)	3.94
22B (*L. rhamnosus*)	2.23
A24 (*L. paracasei*)	3.04
BAP3 (*L. rhamnosus*)	2.58
BMS2 (*L. plantarum*)	2.67
CJS1 (*L. paracasei*)	3.26
70A (*L. gasseri*)	2.22
78A (*L. gasseri*)	3.81
GVS_2 (*L. gasseri*)	3.16

Tableau 13 : Résultats de l'adhérence des 13 souches sur disques d'hydroxyapatite recouvert de salive

4.2.Evaluation de l'activité antibactérienne

Trois méthodes différentes ont été envisagées pour tester le pouvoir inhibiteur de nos isolats cliniques de lactobacilles envers quatre pathogènes oraux. Comme dans le cas de l'évaluation des propriétés d'adhérence, toutes les expériences ont été réalisées en triplicata et les résultats sont exprimés sous la forme de la moyenne des valeurs obtenues.

4.2.1. Méthode de type antibiogramme

L'évaluation de l'activité antibactérienne par une méthode de type antibiogramme a été conduite sur les dix isolats cliniques retenus pour leur adhérence ainsi que sur les trois

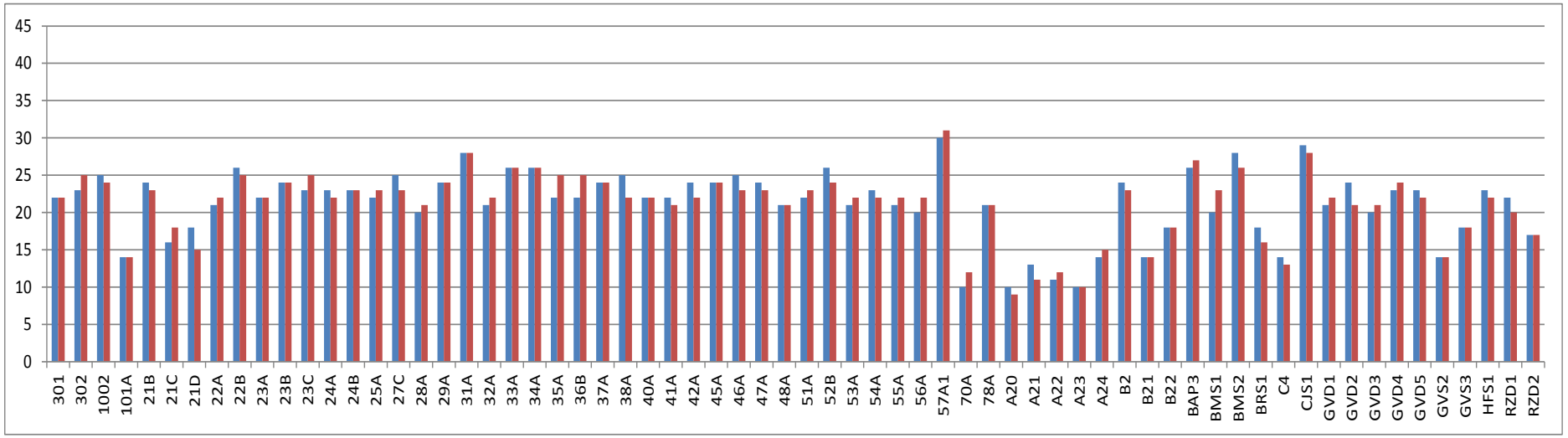
souches de lactobacilles du commerce les plus adhérents (*L. brevis* ATCC 14869, *L. buchneri* ATCC 11305 et *L. fermentum* ATCC 9338). Aucune des fractions (surnageants ou suspensions de culot) n'a montré d'activité inhibitrice sur les pathogènes testés, *Fusobacterium nucleatum* et *Porphyromonas gingivalis*.

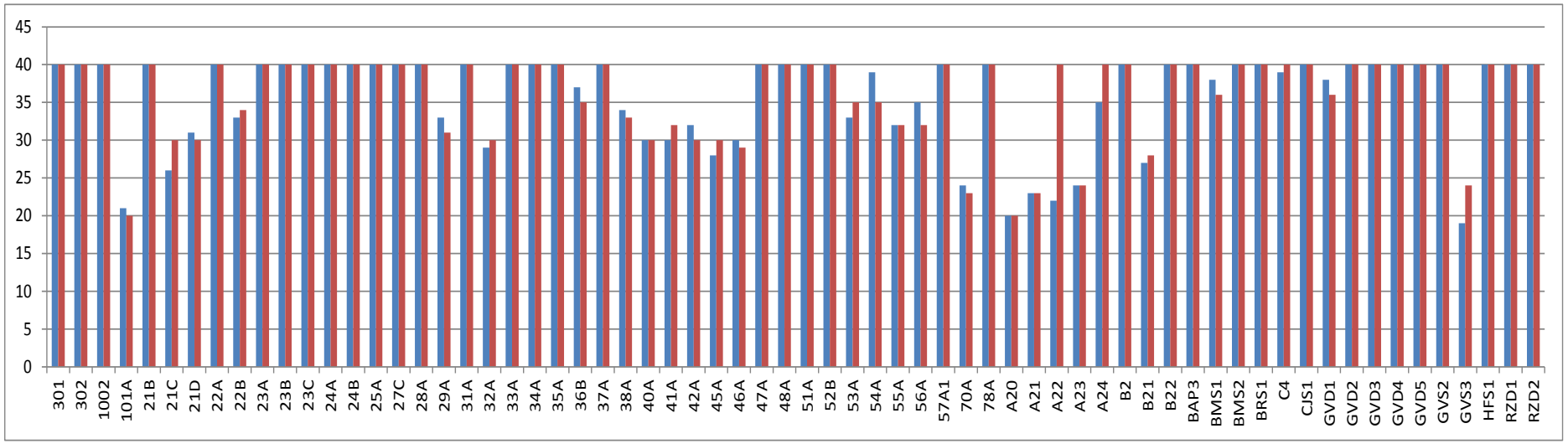
4.2.2. Méthode de co-culture en milieu liquide

L'évaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de co-culture en milieu liquide a été conduite sur les mêmes souches que précédemment contre l'ensemble de nos 4 pathogènes.
Les résultats n'ont pas été concluants (écart-type important donnant une faible valeur aux moyennes obtenues).

4.2.3. Méthode de la double gélose

L'intégralité de nos souches a été évaluée pour leur capacité à inhiber les quatre pathogènes selon cette méthode. Celle-ci s'est en effet révélée reproductible et de lecture aisée. L'ensemble des résultats est reporté sous la forme de quatre graphiques (Figure 3). Ceux-ci montrent également les résultats d'inhibition quand le spot de lactobacilles a été préalablement traité avec une protéase.
L'analyse de ces résultats montre que l'ensemble des isolats cliniques a inhibé *S. mutans* et *A.viscosus* sur une période de 48h. 52 souches ont faiblement inhibé *P. gingivalis* et seulement deux souches n'ont eu aucune activité inhibitrice sur *F. nucleatum*. Les zones d'inhibition s'étendent de 9 mm à 30 mm pour *S. mutans*, de 18mm à plus de 40mm pour *A. viscosus*, de 9mm à plus de 40mm pour *F. nucleatum* et de 7 à 18mm pour *P. gingivalis*. Pour avoir des résultats réellement discriminants, un seuil a été défini afin de qualifier les souches comme sensibles à l'activité inhibitrice des lactobacilles, il a été fixé à 25mm de diamètre d'inhibition. Selon ce seuil, *P. gingivalis* n'est sensible à aucune souche, *F. nucleatum* est sensible à 55 souches, *A. viscosus* à 59 souches et *S. mutans* à 9 souches. Ces 9 souches (22B, 31A, 33A, 34A, 52B, 57A1, BAP3, BMS2 et CJS1) possèdent le plus large spectre d'inhibition.
Aucune inactivation de l'activité inhibitrice n'a été notée après le traitement avec la protéinase K. Au contraire, la souche A22 (*L. paracasei*) a montré une augmentation de son activité inhibitrice contre *A. viscosus* après ce traitement.


45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
301 302 1002 101A 21B 21C 21D 22A 22B 23A 23B 23C 24A 24B 25A 27C 28A 29A 31A 32A 33A 34A 35A 36B 37A 38A 40A 41A 42A 45A 46A 47A 48A 51A 52B 53A 54A 55A 56A 57A1 70A 78A A20 A21 A22 A23 A24 B2 B21 B22 BAP3 BMS1 BMS2 BRS1 C4 CJS1 GVD1 GVD2 GVD3 GVD4 GVD5 GVS2 GVS3 HFS1 RZD1 RZD2


45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
301 302 1002 101A 21B 21C 21D 22A 22B 23A 23B 23C 24A 24B 25A 27C 28A 29A 31A 32A 33A 34A 35A 36B 37A 38A 40A 41A 42A 45A 46A 47A 48A 51A 52B 53A 54A 55A 56A 57A1 70A 78A A20 A21 A22 A23 A24 B2 B21 B22 BAP3 BMS1 BMS2 BRS1 C4 CJS1 GVD1 GVD2 GVD3 GVD4 GVD5 GVS2 GVS3 HFS1 RZD1 RZD2

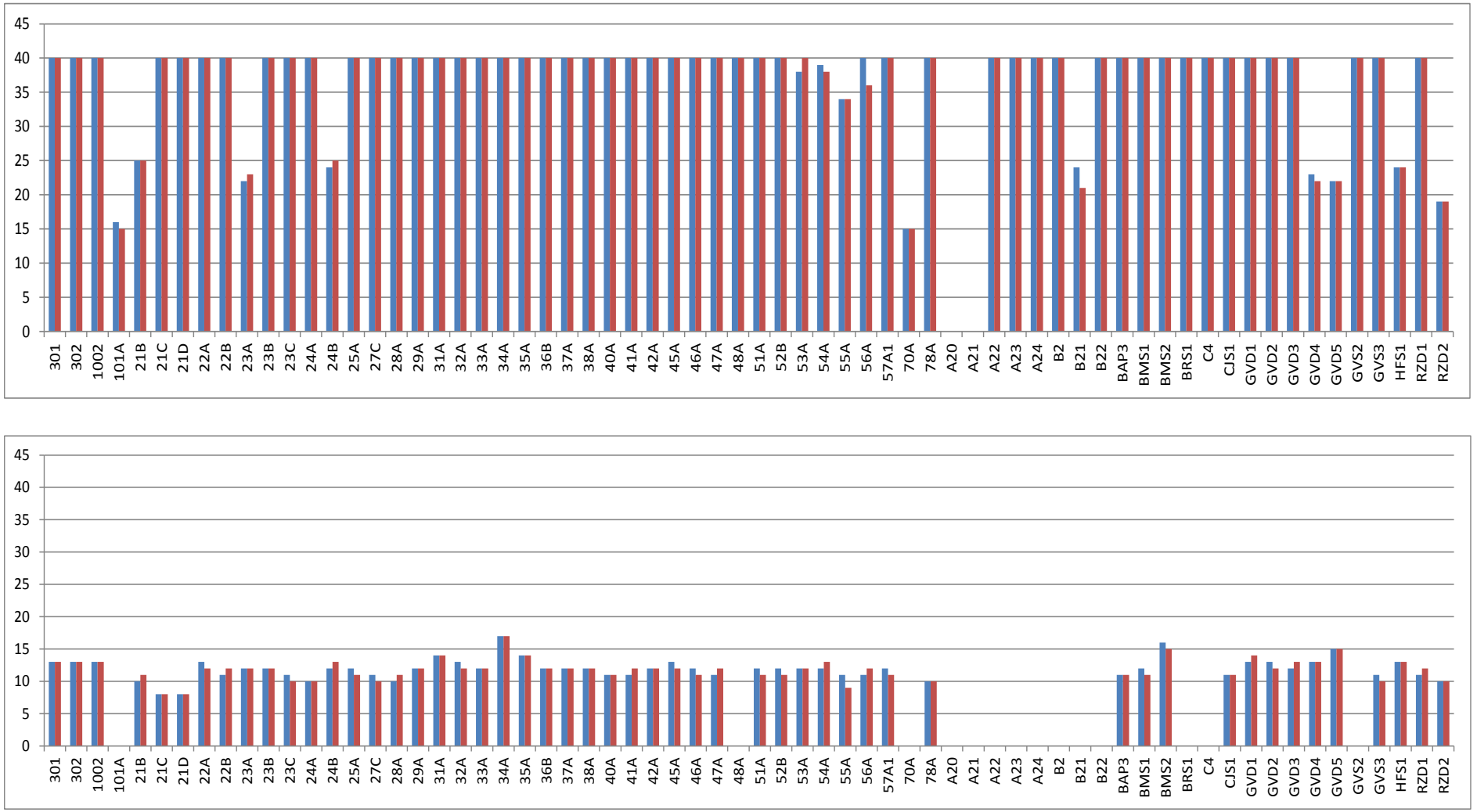


Figure 3 : Diamètres d'inhibition observés contre les 4 pathogènes oraux utilisés

(en bleu : traitement sans protéase, en rouge : traitement avec protéase)

4.2.4. Méthode colorimétrique d'évaluation de la production de peroxyde d'hydrogène

Pour comprendre les mécanismes responsables des propriétés inhibitrices de nos lactobacilles, nous avons évalué leur capacité à produire du peroxyde d'hydrogène selon une méthode colorimétrique initialement décrite par Eschenbach (70); les souches productrices présentent une coloration bleue sur la gélose révélatrice (Figure 4).

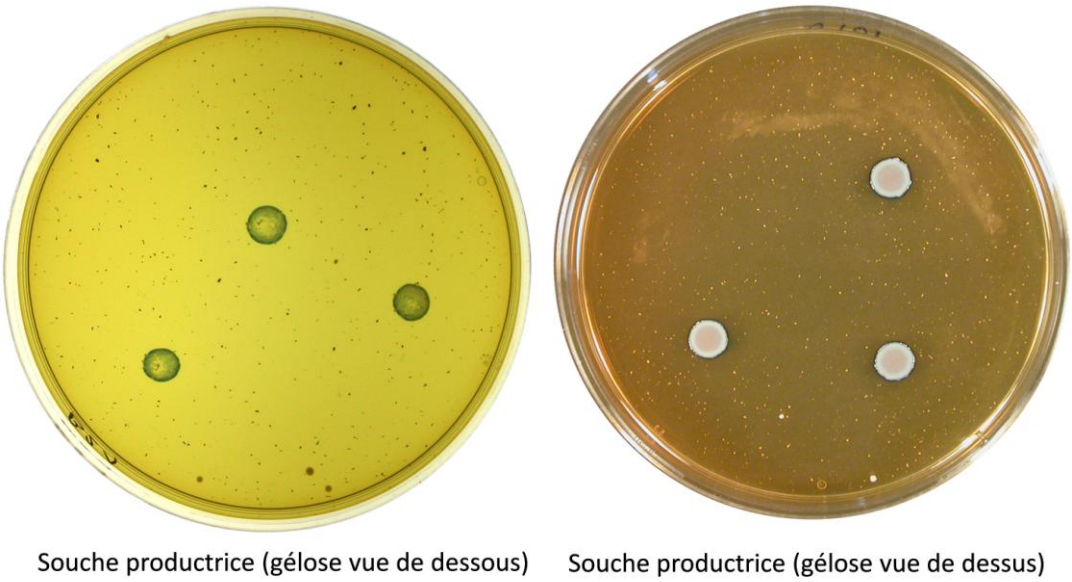


Figure 4 : Méthode colorimétrique d'évaluation de la production de peroxyde d'hydrogène.

Sept souches appartenant à plusieurs espèces de lactobacilles se sont révélées positives concernant la production de peroxyde d'hydrogène (Tableau 14).

Espèces	Souches
L. acidophilus	B21, 21D
L. brevis	21C, 22A
L. gasseri	101A
L. paracasei	A24
L. plantarum	BMS1

Tableau 14 : Isolats cliniques positifs pour la production de peroxyde d'hydrogène

4.2.5. Essai d'extraction de bactériocine : utilisation d'une souche productrice connue *L. gasseri* LA39

Les 12 différents échantillons obtenus après filtration ou traitement au sulfate d'ammonium ont été testés sur les pathogènes *Streptococcus mutans* ATCC25175 et *Actinomyces viscosus* ATCC15987 afin de voir si leur croissance était inhibée. Tous les résultats d'inhibition se sont avérés négatifs. Pour vérifier la présence de notre bactériocine dans nos échantillons, nous avons réalisé une électrophorèse.

Remarque : La dernière lettre de la dénomination de l'échantillon indique le traitement qu'il a subi. Les échantillons extrait brut B (EBB) et surnageant 100 A (S100A) ont été éliminés pour cause de contamination.

Les extraits montrent la présence de nombreuses protéines en particulier dans les culots de l'ajustement à 50% de sulfate d'ammonium (C50A et C50B). Cependant, il n'est pas possible de confirmer la présence de notre bactériocine. Celle-ci a un poids moléculaire de 5600 Da et la migration électrophorétique n'a pas permis de séparer les protéines en deçà de 6500Da.

4.2.6. Evaluation de l'effet inhibiteur de l'acide lactique sur nos bactéries pathogènes

Pour vérifier l'effet inhibiteur de l'acide lactique sur les 4 pathogènes oraux de notre étude, des disques de papier imbibés de concentration croissante d'acide ont été placés sur des géloses préalablement ensemencées ave un de nos pathogènes. Aucun des diamètres d'inhibition observés n'étaient supérieur à 15mm de diamètre (Tableau 15). Les souches les plus inhibées sont comme dans la méthode de double gélose, *A. viscosus* et *F. nucleatum*.

	Concentration d'acide lactique en g/L			
	20	30	40	50
S. mutans	0	0	8	9
A. viscosus	0	9	10	13
F. nucleatum	0	9	11	15
P.gingivalis	0	0	8	10

Tableau 15 : Diamètres d'inhibition mesurés en fonction de la concentration d'acide lactique pour les 4 pathogènes oraux de l'étude

4.3. Recherche des déterminants génétiques ayant une expression phénotypique potentiellement probiotique

4.3.1. Recherche du gène de la gasséricine A chez nos souches identifiées comme *L. gasseri*

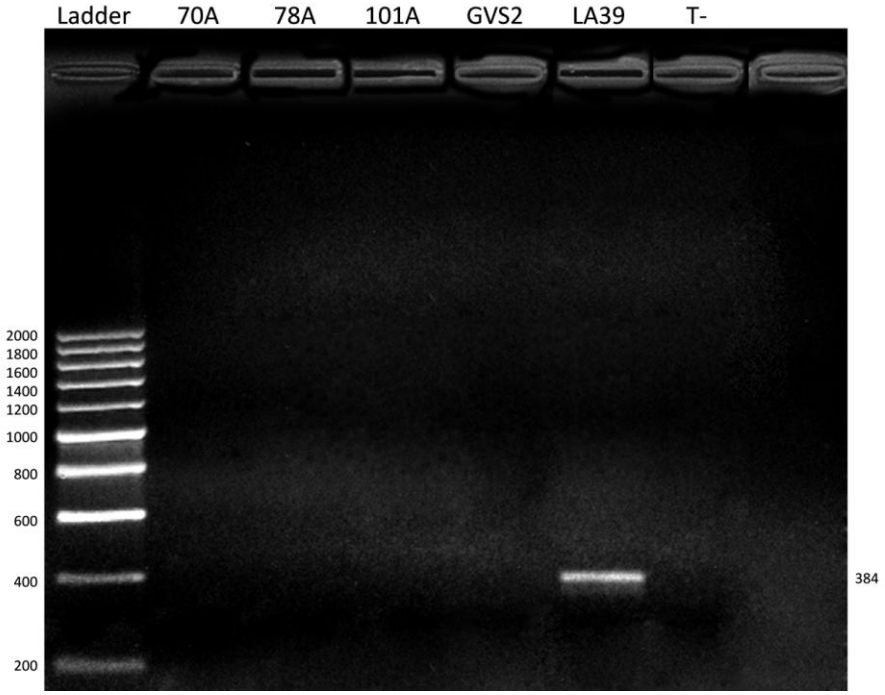


Figure 5 : Gel d'électrophorèse pour la recherche du gène de la gasséricine A

(T$^-$ correspond au témoin négatif et LA39 est notre témoin positif, *Lactobacillus gasseri* LA39)

Aucun de nos 4 isolats cliniques de *L. gasseri* (70A, 78A, 101A et GVS2) n'a montré la présence de la gasséricine A (figure 5).

4.3.2. Recherche du gène de la glycérol déshydratase

La recherche de la séquence partielle du gène codant pour la glycérol déshydratase a été réalisée sur l'ensemble de nos isolats cliniques. Sur les 66 souches testées, une seule souche (*Lactobacillus gasseri*, GVS2) a montré un produit de PCR dont la taille correspondait à la taille de la séquence attendue (figure 6).

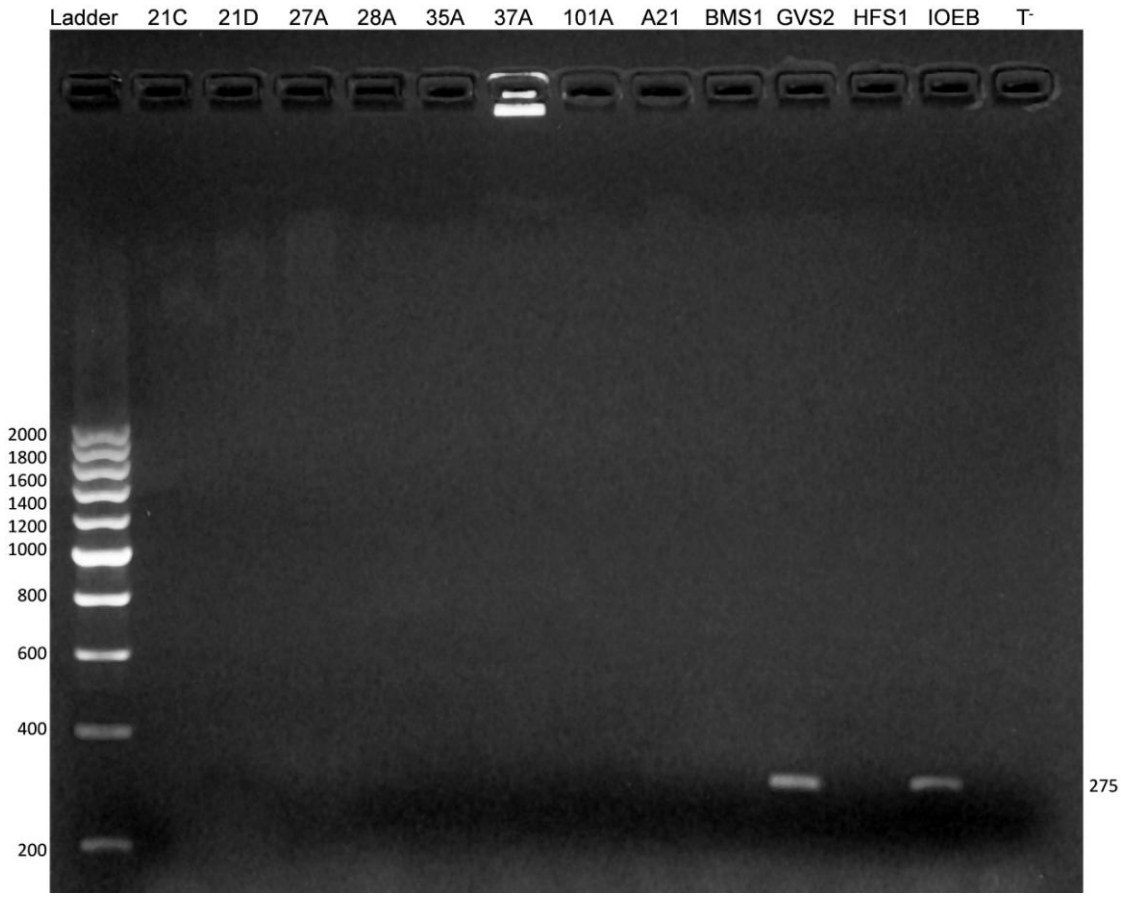


Figure 6 : Gel d'électrophorèse pour la recherche du gène de la glycérol déshydratase

(T^- correspond au témoin négatif et IOEB est notre témoin positif, *Lactobacillus collinoides* IOEB 9527)

La séquence obtenue d'une longueur d'environ 275 pb a été amplifiée et séquencée avec les amorces GD1 et GD2 (45). Les enchaînements nucléotidiques, obtenus à partir du séquençage, ont été alignés entre eux et corrigés en utilisant le logiciel BioEdit. Après correction et élimination des zones de trop grande incertitude, nous avons obtenu une séquence de 225pb qui a pu être comparée aux séquences disponibles dans Genbank en utilisant le logiciel BlastN. Cette comparaison a montré que notre séquence avait 81% d'identité avec la séquence partielle de la région codant pour la sous-unité C de la glycérol déshydratase d'un *Lactobacillus hilgardii* (annexe 6). Notre séquence a donc été annotée et déposée sur Genbank sous le numéro d'accès JX505431. Les informations disponibles sur GenBank sont reportées en annexe 7.

4.3.3. Recherche de gènes codant pour des glucosyltransférases

La recherche de gènes codant pour les glucosyltransférases a été conduite sur l'ensemble de nos souches en utilisant des amorces décrites par Kralj et al. et Oho et al.

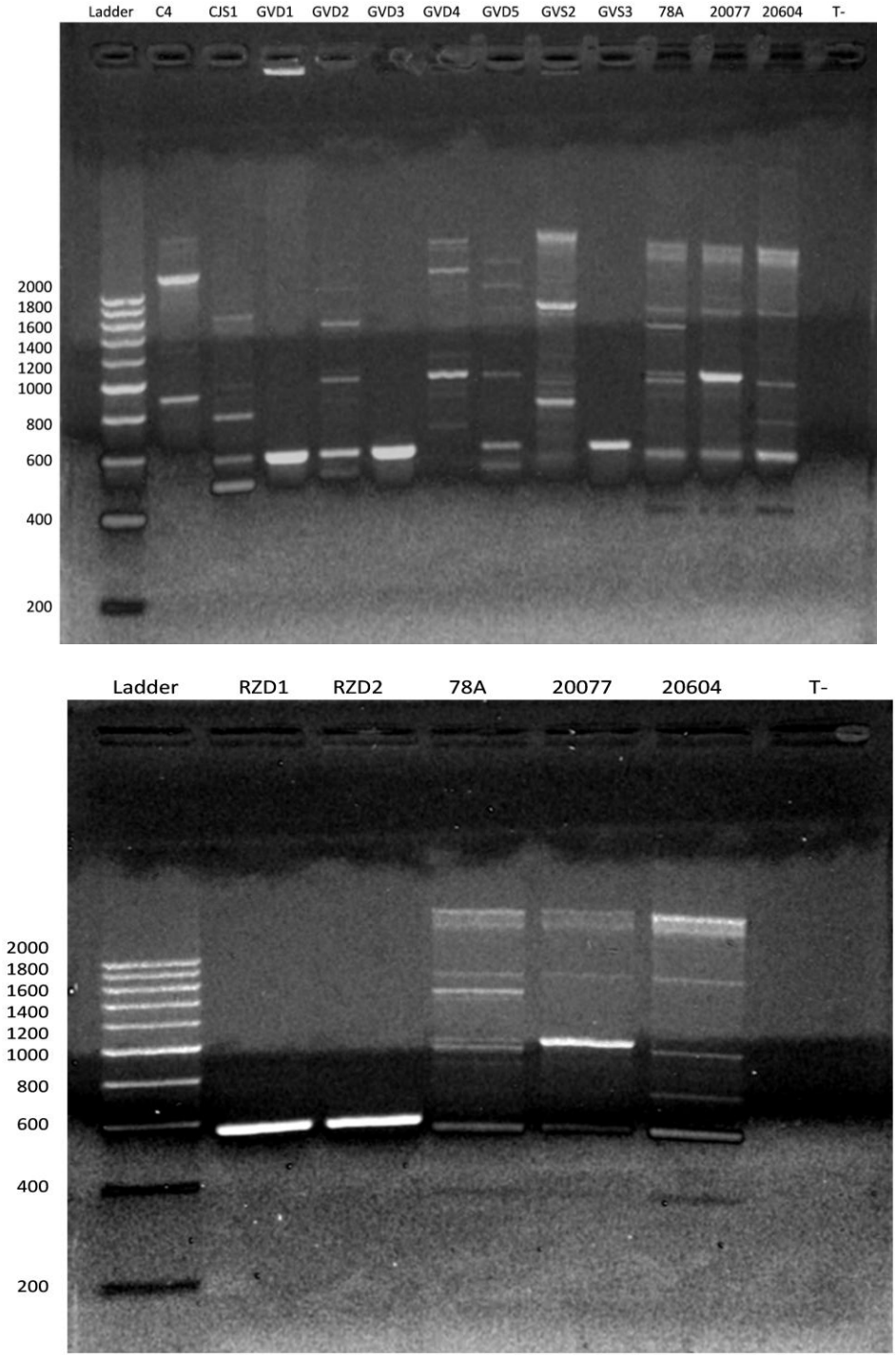


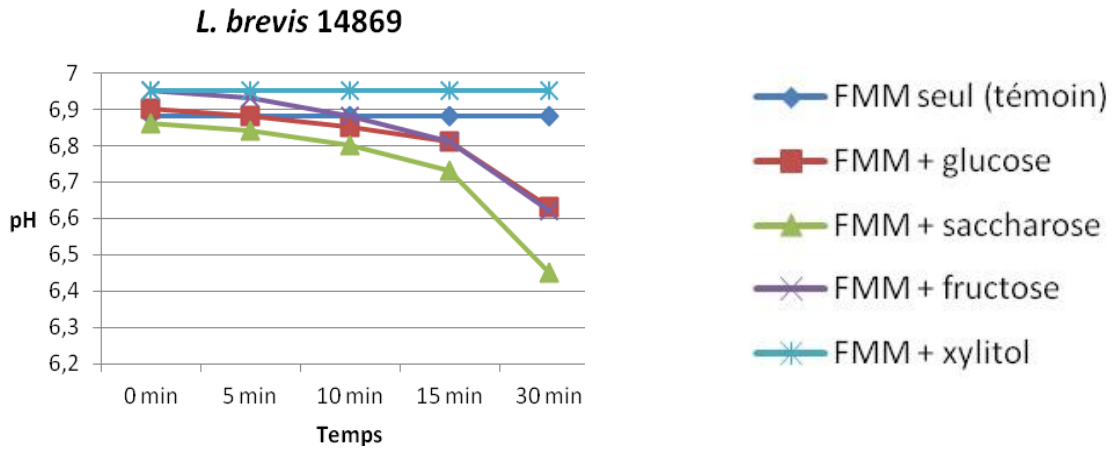
Figure 7 : Gels d'électrophorèse pour la recherche de gènes codant pour des glucosyltransférases

(T^- correspond au témoin négatif et 20077 et 20604 sont nos témoins positifs, *L. gasseri* DSM 20077 et *L. gasseri* DSM 20604)

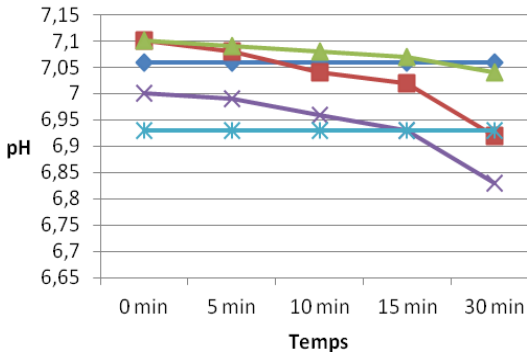
L'utilisation de ces amorces a entrainé l'obtention de produits de PCR de différentes tailles pour chaque souche sauf pour les souches RZD1 et RZD2 (qui n'ont montré qu'une bande unique autour de 600pb) (figure 7). Bien que la taille des produits de PCR attendus se situe autour de 660pb, nous avons tenté de récupérer des bandes de différentes tailles pour identifier les séquences nucléotidiques amplifiées. Cette tentative a été infructueuse. Lorsque l'ADN des bandes de poids moléculaire supérieur à 660 pb était récupéré à partir du gel, son amplification *de novo* (qui s'avérait indispensable, l'ADN récupéré étant généralement de quantité peu importante) donnait des bandes de poids moléculaire inférieur à celle initialement isolée; on n'avait donc jamais une séquence d'ADN unique à séquencer. Nous avons cependant pu séquencer la bande autour de 600 pb pour certaines souches (RZD1 et HFS1), l'identification des séquences partielles obtenues a donné plus de 75 % d'identité avec la séquence d'enzymes impliquées dans le métabolisme du mandélate (une mandélate racémase et une enzyme de lactonisation du muconate) chez *L. rhamnosus* ATCC 53103 mais aussi avec la séquence du gène codant pour une galactonate déshydratase chez cette même souche de *L. rhamnosus* aussi connue sous le nom de *L. rhamnosus* GG (annexe 8).

4.4.Mesure de l'activité fermentaire des lactobacilles

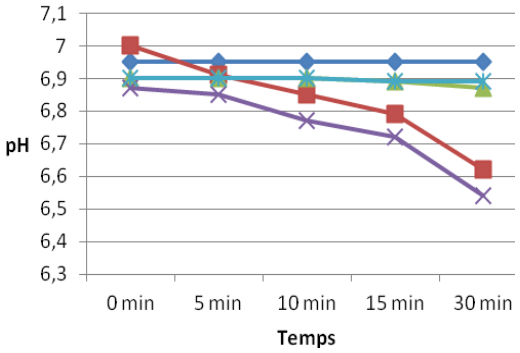
La capacité des isolats cliniques les plus adhérents sur tube de verre a été évaluée afin de vérifier leur capacité à fermenter des sucres (glucose, saccharose et fructose) ou un polyol (le xylitol). Les variations de pH au cours du temps (témoins de l'activité fermentaire) ont été recueillies et transcrites sous forme d'un graphique pour chaque souche (Figure 8).



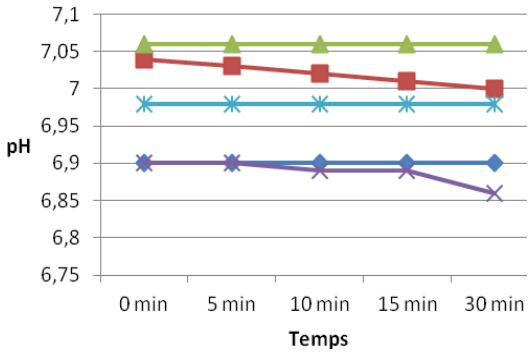
L. buchneri 11305



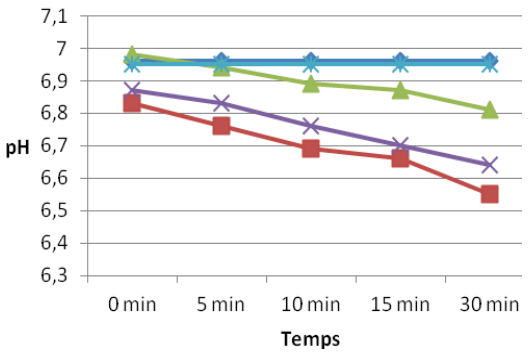
L. fermentum 9338



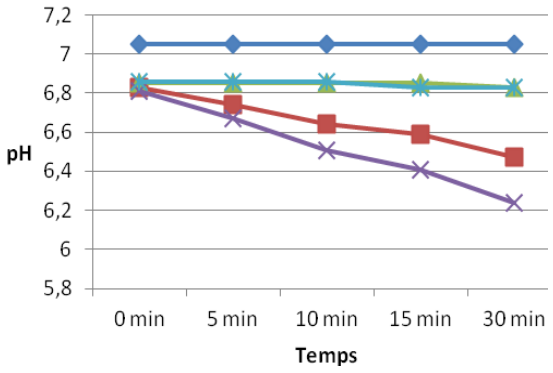
22A



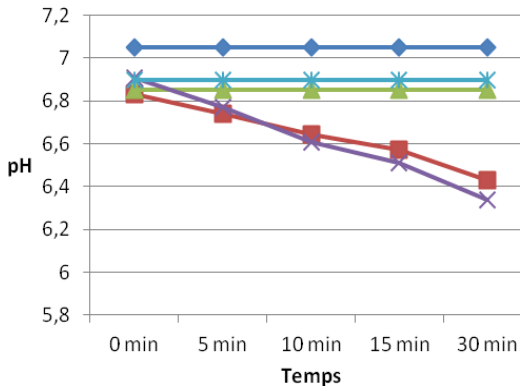
24B



70A



78A



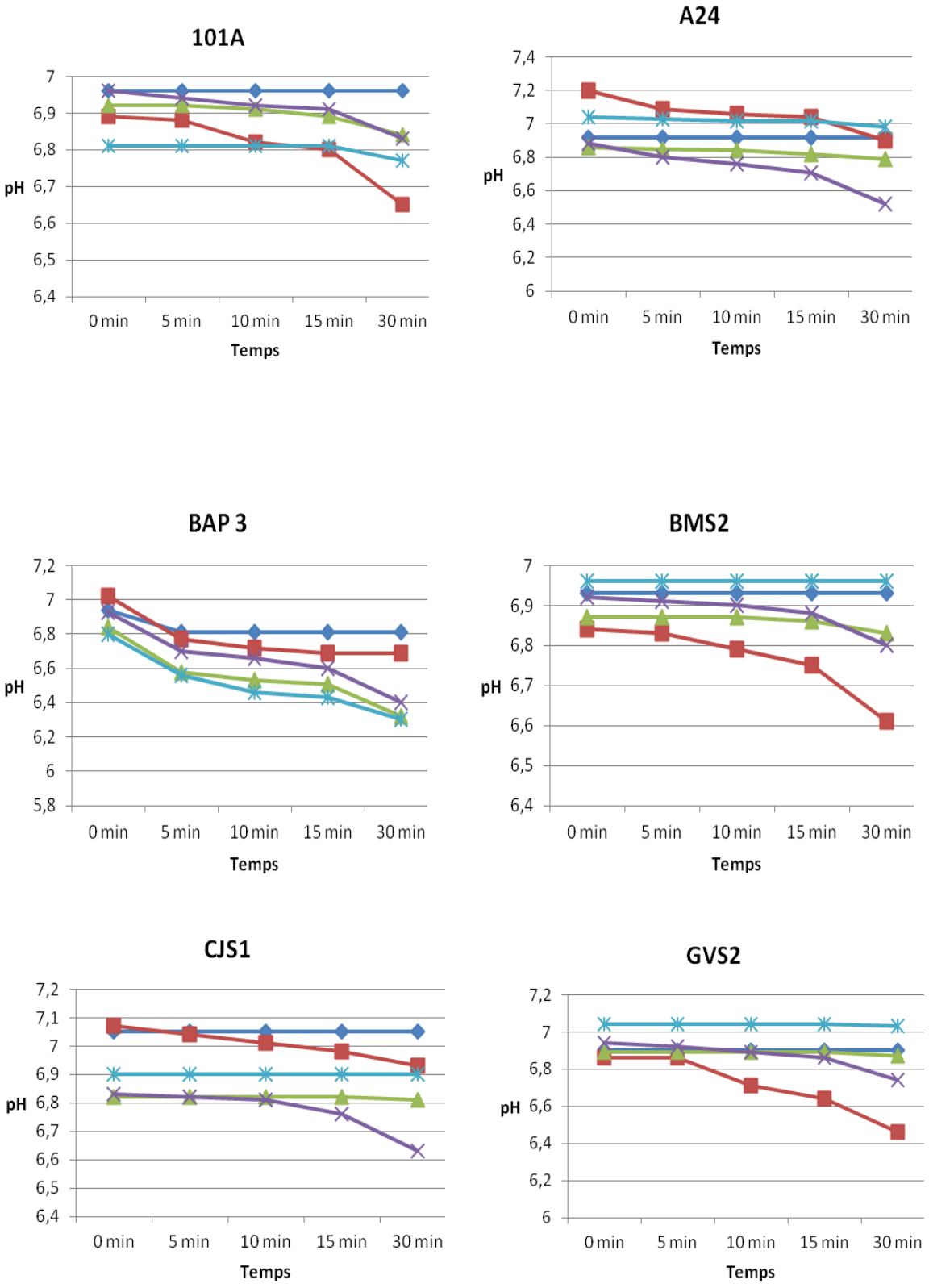


Figure 8 : Courbes d'évolution du pH d'un milieu (FMM ± sucre) selon la bactérie qui y est placée au cours du temps

L'analyse des valeurs pHmétriques relevées à 30 min et résumées dans le Tableau 16 montre qu'aucune des souches n'a entrainé une chute de pH dans des valeurs inférieures à celle du pH critique de déminéralisation amélaire (pH de 5.5).

Souche	pH final après 30 min				
	FMM seul	Glucose	Saccharose	Fructose	Xylitol
***L. brevis* ATCC 14869**	6.88	6.63	6.45	6.62	6.95
***L. buchneri* ATCC 11305**	7.06	6.92	7.04	6.83	6.93
***L. fermentum* ATCC 9338**	6.95	6.62	6.87	6.54	6.89
22A *(L. brevis)*	6.90	7.00	7.06	6.86	6.98
24B (*L. rhamnosus*)	6.96	6.55	6.81	6.64	6.95
70A (*L. gasseri*)	7.05	6.47	6.83	6.24	6.83
78A (*L. gasseri*)	7.05	6.43	6.85	6.34	6.9
101A (*L. gasseri*)	6.96	6.65	6.84	6.83	6.77
A24 (*L. paracasei*)	6.92	6.9	6.79	6.52	6.98
BAP3 (*L. rhamnosus*)	6.81	6.69	6.32	6.40	6.30
BMS2 *(L. plantarum)*	6.93	6.61	6.83	6.80	6.96
CJS1 (*L. paracasei*)	7.05	6.93	6.81	6.63	6.90
GVS2 (*L. gasseri*)	6.90	6.46	6.87	6.74	7.03

Tableau 16 : Synthèse des valeurs pHmétriques pour les différentes souches en milieu FMM ± sucre à T = 30min

5. Discussion

Nos travaux avaient pour objectif de sélectionner des lactobacilles salivaires qui pourraient avoir une action probiotique dans la cavité buccale. Pour cela, nous nous sommes basés sur des recommandations de l'OMS et de l'ONUAA adaptées pour l'occasion à la spécificité de la sphère orale. Il était donc nécessaire d'évaluer la capacité de nos souches (candidats au qualificatif de probiotique) de persister dans la cavité buccale, d'inhiber des pathogènes oraux, de stimuler l'immunité locale tout en étant d'une totale innocuité pour l'hôte. Notre étude a porté sur 66 isolats cliniques et a permis d'isoler des souches qui montraient de bonnes capacités d'adhérence et inhibitrices contre plusieurs pathogènes.

Afin d'effectuer un screening rapide des souches, la première méthode utilisée dans notre étude pour évaluer l'adhérence est la méthode sur tube de verre décrite par Mukasa et Slade, modifiée par Hamada et Torii (93, 170). En se basant sur les travaux de Mukasa et Slade sur les streptocoques (170), cette méthode permettrait de plus d'évaluer la production d'exopolysaccharides (EPS) par les lactobacilles. En effet, dans ce modèle où la surface de verre mime les surfaces dures dentaires, l'adhésion pourrait être médiée par des EPS comme dans la situation *in vivo*. Ce modèle a déjà été validé pour *S. mutans* (92, 162, 244). Nos résultats suggèrent que des souches sauvages de lactobacilles oraux sont en mesure de produire des exopolysaccharides puisqu'une dizaine de nos souches ont été capables d'adhérer à une surface de verre. Les études faisant état de production d'EPS par des lactobacilles oraux sont peu nombreuses (61, 95, 146), mais elles le sont plus en ce qui concerne certaines espèces utilisées dans l'industrie alimentaire (132, 133).

Bien que l'adhérence permise par les exopolysaccharides soit une adhérence de type irréversible, il nous a semblé important d'évaluer dans un système complexe comme la cavité buccale, les mécanismes d'adhésion primaire (adhésion réversible) chez les souches ayant montré des capacités à persister sur des tissus durs. En effet, ces mécanismes d'adhésion primaire sont les premiers à intervenir dans l'initiation de l'adhérence bactérienne à une surface. Parmi ceux-ci, l'hydrophobicité de la surface bactérienne est un mécanisme d'adhérence majeur dans la bouche (209) car elle joue un rôle clé dans le premier contact entre une cellule bactérienne et le mucus (recouvrant la surface amélaire par exemple) ou les cellules épithéliales (218, 270).

Pour mesurer l'hydrophobicité de surface, de nombreuses méthodes sont disponibles mais l'une des plus citées dans la littérature et utilisées de par sa facilité de mise en œuvre, reste la méthode MATH (Microbial Adhesion To Hydrocarbons) (208). Cependant, cette méthode n'évalue que l'hydrophobicité de surface des bactéries et d'autres méthodes dérivées de celles-ci ont vu le jour. Notamment la méthode MATS que nous avons utilisé ici, car elle permet de

déterminer non seulement l'hydrophobicité, mais aussi le caractère donneur d'électrons ou accepteur d'électrons (respectivement base ou acide de Lewis) de la surface de la cellule. Ce caractère peut permettre d'expliquer la survenue de liaisons covalentes qui peuvent aider à l'établissement de l'adhérence irréversible.

Selon la classification établie par Ahumada (5), nos souches montrent des propriétés d'hydrophobicité de faible à modérée. Étant donné la fiabilité de ces techniques validées par d'autres chercheurs pour leur efficacité à prédire les capacités d'adhésion (209), ces résultats pourraient indiquer que les trois souches montrant une hydrophobicité moyenne ont une bonne capacité de colonisation des tissus durs de la cavité buccale. Les résultats d'hydrophobicité que nous avons obtenu sont comparables aux valeurs obtenues pour les souches les plus adhérentes dans certaines études (68, 130, 234). Cependant, il est important d'avoir à l'esprit que l'hydrophobicité de surface est un paramètre fragile. Il a été montré qu'elle peut être significativement altérée par l'exposition à des concentrations subinhibitrices d'antibiotiques, de surfactants ou de lectines (2). Bien que l'hydrophobicité soit habituellement considérée comme stable chez les bactéries Gram positif (236), ceci est de plus en plus remis en question. Deepika et al. ont montré chez *L. rhamnosus GG* qu'elle variait au cours des différentes phases de croissance bactérienne mais aussi en fonction des conditions de fermentations (62, 63). A côté de cela, il est important de prendre en compte que le contact initial lors de l'adhésion se passe entre la bactérie et un support généralement conditionné (pour la cavité buccale, la dent ou les muqueuses recouverts d'un film salivaire), et que le conditionnement de la surface peut modifier de façon importante son hydrophobicité (69). L'hydrophobicité de surface semblant très dépendante des conditions environnementales, la possibilité de tester d'autres mécanismes d'adhésion réversible par la méthode MATS comme la survenue de liaisons covalentes nous a semblé intéressante. Nos souches les plus hydrophobes ont également montré de hauts scores d'adhérence avec le solvant monopolaire utilisé dans notre étude, c'est-à-dire le chloroforme. Cette forte affinité pour le chloroforme peut être due aux propriétés basiques (base de Lewis) de la cellule bactérienne. Le caractère basique est probablement lié à la présence de groupes carboxyliques sur la surface microbienne (18).

Pour mimer de façon plus fidèle la situation *in vivo*, nous avons testé l'adhérence de nos 10 souches les plus performantes avec la méthode "tube de verre" sur un modèle de biofilm monoespèce sur disque d'hydroxyapatite recouvert d'un film salivaire. Bien qu'il y ait quelques différences entre la composition de la pellicule obtenue sur l'hydroxyapatite (HA) entre la situation *in vivo* et celle *in vitro* (32), il semble que ce modèle soit pertinent pour

évaluer l'adhésion bactérienne dentaire, la structure cristalline de l'hydroxyapatite étant proche de celle de l'émail. Nos isolats ont adhéré à l'hydroxyapatite recouvert d'une couche de salive. Ces résultats sont en accord avec d'autres études qui ont récemment démontré que la souche probiotique *L. rhamnosus GG* peut adhérer à la salive sur un support d'hydroxyapatite (98, 234).

L'exploration de ces divers mécanismes impliqués dans l'adhésion bactérienne a permis la sélection de trois souches de lactobacilles sauvages d'intérêt qui se sont révélés être des *L. gasseri* (GVS2, 70A et 78A).

Les résultats de ces travaux sur l'adhérence ont fait l'objet de la publication d'une premier article (215).

Nous avons voulu étudier l'innocuité de nos souches les plus adhérentes vis à vis du risque carieux. Pour cela, l'activité fermentaire a été évaluée pour trois sucres et un polyol dans un milieu chimiquement défini dénommé Fermentation Minimum Medium (FMM) (58). Cette méthode avait déjà été utilisée par Haukioja et al. pour évaluer le risque cariogène de certains lactobacilles (97). Nos souches ainsi que celles utilisées à titre de comparaison se sont révélées potentiellement peu cariogènes ; aucune souche ne faisait diminuer le pH en dessous de 5.5, la valeur critique de déminéralisation de l'émail (235). Cette étude confirme également la faible capacité des souches à fermenter le xylitol. L'évaluation de l'activité fermentaire réalisée ici ne permet toutefois pas d'éliminer de façon certaine, le risque cariogène. En effet, au sein de la plaque dentaire, les concentrations de sucres pourraient être plus élevées puisque la diffusion de la salive, qui a un rôle de tampon, est moindre dans le biofilm constitué (111). Les bactéries potentiellement cariogènes seraient alors plus longtemps en contact avec une quantité plus importante de sucres, ceci pouvant avoir un effet délétère. Cette évaluation devrait donc se faire idéalement au sein d'un modèle de biofilm pluriespèce.

Comme l'activité antimicrobienne contre les pathogènes potentiels est considérée comme un trait important en terme d'efficacité des probiotiques, l'étape suivante de ce travail s'est tournée vers la mise en évidence de propriétés inhibitrices de nos souches vis à vis de souches considérées comme des pathogènes oraux. Nous avons été amené à tester plusieurs méthodes devant les limites que présentaient certaines techniques.

La méthode de l'antibiogramme avait été initialement choisie pour son caractère unanimement reconnue dans l'évaluation des propriétés inhibitrices d'une substance. Le surnageant de culture ainsi que le culot resuspendu dans une solution saline de nos 10 lactobacilles les plus adhérents ont été testés contre les pathogènes parodontaux, *F. nucleatum* et *P.gingivalis*. Nous n'avons observé aucune inhibition. L'absence d'effets antibactériens constatés n'élimine

nullement la possibilité que nos souches sécrètent des molécules inhibitrices mais pose le problème d'une éventuelle trop grande dilution de ces molécules inhibitrices dans le surnageant.

Nous avons alors adapté une deuxième méthode d'évaluation basée cette fois sur la compétition de croissance entre nos lactobacilles et les 4 pathogènes de notre étude dans un milieu liquide. Les résultats ont là aussi été peu concluants avec des disparités importantes entre les expériences menées en triplicata. La mise en évidence de biais importants comme les temps de générations bactériens différents ou encore la possible implication de l'effet Jameson (109) dans l'inhibition observée a justifié l'abandon de cette méthode.

La dernière méthode testée a été la méthode de double gélose ou encore méthode de la gélose superposée adaptée de la méthode initialement décrite par Fleming (74). Cette technique a permis d'obtenir des résultats reproductibles et d'effectuer une sélection rapide de souches inhibitrices. Dans un premier temps, le pouvoir inhibiteur vis à vis des pathogènes oraux a été évalué sur les 10 souches les plus adhérentes mais l'absence d'effet satisfaisant sur l'ensemble des 4 pathogènes, nous a amené à évaluer l'ensemble des 66 souches dans l'éventualité d'associer des souches fortement adhérentes et fortement inhibitrices. L'absence de référentiels nous a contraints à définir de façon arbitraire la sensibilité des pathogènes aux molécules antibactériennes produites par nos lactobacilles. Toutefois les valeurs retenues, pour qualifier une souche de sensible, sont largement inspirées des recommandations du comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (SFM) (223). Ceci nous a amené à considérer que *P. gingivalis* n'est sensible à aucune des molécules antibactériennes produites par nos souches (dans les conditions expérimentales). Par contre, *F. nucleatum* et *A. viscosus* ont montré une sensibilité contre plus d'une cinquantaine de lactobacilles. *S. mutans* a été beaucoup moins sensible et seulement neuf souches ont été considérées comme inhibitrices. Nous avons classé ces 9 souches comme inhibitrices puisqu'elles inhibaient également *F. nucleatum* et *A. viscosus*.

Afin d'éclaircir les mécanismes des inhibitions observés, nous avons conduit en parallèle la même expérience en recouvrant les spots de protéinase K. Aucune modification notable des diamètres n'a été constatée excepté pour la souche A22 (*L. paracasei*). Pour cette souche, l'application de protéase a eu pour conséquence le doublement du diamètre d'inhibition. Ceci pourrait être dû au fait que la molécule inhibitrice ait été sous la forme d'un propeptide et qu'elle ait été clivée en une forme active.

L'exploration des mécanismes d'inhibition nous a mené à rechercher d'autres molécules pouvant éventuellement être impliquées, selon les données de la littérature.

Le peroxyde d'hydrogène (H_20_2) fait partie de ces substances. En effet, l'inhibition de la croissance d'une espèce bactérienne par l' H_20_2 généré par une autre espèce est un mécanisme bien connu de l'antagonisme bactérien (107, 184). Sept de nos souches se sont révélées positives en accord avec des travaux précédents montrant que certaines bactéries lactiques peuvent produire de l'H_2O_2 (14). Toutefois ces 7 souches ne faisaient pas partie du groupe des 9 souches inhibitrices. Ces résultats montrent que le peroxyde d'hydrogène n'est pas le principal mécanisme inhibiteur de nos bactéries. Ils confirment les conclusions de certains chercheurs qui établissent que le peroxyde d'hydrogène participe à l'effet antimicrobien, mais n'est pas la principale molécule inhibitrice des lactobacilles (181, 237).

Les propriétés inhibitrices de l'acide lactique (le principal acide organique produit par les lactobacilles) ont également été évaluées à différentes concentrations. Mais les diamètres d'inhibition obtenus sont largement inférieurs à ceux obtenus par les spots de lactobacilles. Silva et al. avaient observé les mêmes résultats lorsqu'ils avaient comparé les diamètres d'inhibition obtenus avec *L. rhamnosus* GG et des concentrations croissantes d'acide lactique (226). Cela nous amène à penser que les acides organiques produits par les lactobacilles ne sont pas seuls responsables de l'effet inhibiteur mais pourraient avoir un rôle facilitateur. Ils permettraient une dégradation de la membrane plasmique des pathogènes, ce qui autoriserait la pénétration d'autres molécules antimicrobiennes à l'intérieur de leur cytoplasme.

L'identité de ces autres molécules antimicrobiennes restait à préciser. Malgré l'échec de la protéinase K à inhiber les effets antibactériens de nos souches, nous avons voulu mettre au point une méthode de recueil rapide des éventuelles bactériocines produites par nos lactobacilles. En effet, des bactériocines peuvent être insensibles à l'action de certaines protéases (16, 108, 204). Comme décrit dans le chapitre Matériels et méthodes, nous avons alors appliqué plusieurs protocoles permettant la récupération de protéines chez une souche productrice connue d'une bactériocine (gasséricine A), la souche *L. gasseri* LA39. En effet, nous voulions développer une méthode rapide permettant d'obtenir ces peptides antimicrobiens. Nous avons donc voulu vérifier si cette activité inhibitrice était due à la production de la gasséricine A. Les échantillons issus de nos différents traitements ont été testé sur les souches *S. mutans* et *A. viscosus* car la souche productrice *L. gasseri* LA39 avait montré une activité inhibitrice modérée sur ces bactéries. Ils n'ont pas été testés sur *F. nucleatum* et *P. gingivalis* car Dortu et al. rappellent dans leur revue qu'aucune bactériocine produite par des bactéries lactiques n'est active sur des espèces Gram négatives (67). Aucun de nos extraits n'a montré d'activité mais nous ne pouvions éliminer la possibilité de la présence de notre bactériocine même sous une forme inactive. Sa présence a donc été

recherchée à l'aide d'une électrophorèse en condition dénaturante. A l'issue de cette migration électrophorétique, les protéines de bas poids moléculaire (inférieur à 6000Da) n'ont pu être correctement séparées (présence d'une bande dense à la partie inférieure du gel). L'électrophorèse ne nous a donc pas permis de vérifier que nous avions bien notre bactériocine. La recherche de la bactériocine n'a pu être poursuivie dans le cadre de ce travail à cause des différents projets déjà entrepris. Mais la poursuite d'une méthode d'isolement rapide et de détection de l'activité des bactériocines pourraient faire l'objet d'une étude à part entière.

Parallèlement à ces évaluations phénotypiques, nous avons mené une étude sur les déterminants génétiques d'intérêt probiotique de nos souches.

Les souches les plus performantes en termes d'adhérence ont été identifiées comme *L. gasseri*. Nous avons voulu, de plus, vérifier chez nos souches appartenant à cette espèce possédaient le gène de la gasséricine A décrite chez LA39. Bien que cette recherche ait été négative, il est possible que ces lactobacilles expriment une autre bactériocine.

La reutérine, molécule initialement décrite chez *L. reuteri*, semble pouvoir être aussi produite par d'autres lactobacilles (161). Cette molécule dérivée du métabolisme du glycérol doit sa production à une enzyme appelée la glycérol déshydratase. Nous avons donc cherché sur l'ensemble de nos souches, le gène codant pour cette enzyme à l'aide d'amorces décrites par Claisse et Lonvaud (45). Une seule souche, GVS2 (*L. gasseri*), présentait le gène en question. Cette souche n'avait pas montré un effet inhibiteur suffisamment intéressant pour être retenue parmi nos 9 souches considérées comme inhibitrices. Toutefois, le test en double gélose a été fait en milieu non supplémenté en glycérol. La séquence obtenue a présenté 81% d'identité avec celle de *L. hilgardii*. Il serait donc utile de vérifier que cette séquence code pour une protéine fonctionnelle autorisant la production de la reutérine.

Cette recherche de déterminants génétiques a été aussi l'occasion de vérifier si les souches les plus adhérentes sur tube de verre, possédaient certaines enzymes responsables de la synthèse des exopolysaccharides, les glucosyltransférases. En effet, ces exopolysaccharides sont intéressants non seulement parce qu'ils sont impliqués dans l'adhésion mais également parce qu'ils pourraient être responsables de la modulation de certains effets immunitaires (221). Initialement, l'amplification des gènes codant pour les GTF avait été envisagée en utilisant uniquement des amorces dégénérées décrites par Kralj et ses collaborateurs (134) mais aucune amplification n'a été obtenue. Nous avons donc décidé de remplacer l'amorce DegRev de Kralj et al. par une amorce décrite par Oho et al. pour l'isolement de la GTF de *Streptococcus*

sobrinus (182). Cette amorce de séquence nucléotidique proche avait l'avantage d'être plus spécifique car non dégénérée ; elle avait d'ailleurs servi à la détermination de la séquence de DegRev. L'amplification a été permise par la combinaison des amorces DegFor et GTFI-R et la migration électrophorétique sur gel d'agarose a montré des produits PCR de tailles différentes situées autour de 600pb, 1000pb, et supérieur à 2000pb. L'ensemble des souches a montré au moins un produit de PCR. Notre but a donc été de récupérer des bandes à ces différents poids moléculaires chez différentes souches afin de les amplifier pour permettre un séquençage. Cette récupération des produits de PCR a globalement été peu efficace surtout pour les produits dont le poids moléculaire était supérieur 600 pb. Les bandes de plus 600 pb qui ont réussi à être récupérées grâce au kit d'extraction donnaient lors de leur amplification supplémentaire à nouveau des produits de tailles plus petites. Ceci pourrait être dû à la faible spécificité des amorces. Un séquençage direct après extraction de la bande du gel n'était pas envisageable; la quantité d'ADN récupérée étant insuffisante. L'extraction des bandes autour de 600 pb a donné les seuls résultats. C'est ainsi que nous avons obtenu pour deux souches (RZD1 et HFS1) en comparant les séquences obtenues sur GenBank à l'aide du logiciel Blast N plus de 75 % d'identité avec la séquence d'enzymes de *L. rhamnosus* ATCC 53103 mais qui n'étaient pas des GTF. La mandélate racémase, l'enzyme de lactonisation du muconate et la galactonate déshydratase sont néanmoins liées entre elles, elles appartiennent toutes à la superfamille des énolases (12). Tout ceci pose la question de l'efficacité de la détection spécifique des GTF par les amorces utilisées qui devront être plus spécifiques. Une stratégie complémentaire phénotypique pourrait être mise en place pour évaluer la production d'EPS par nos souches.

6. Conclusion

En raison du fait que plusieurs espèces de lactobacilles sont des hôtes normaux des muqueuses humaines et au regard d'une longue histoire d'utilisation dans l'industrie alimentaire, ces bactéries sont généralement reconnues comme des organismes sûrs (statut GRAS). Dans ce contexte, certaines espèces de lactobacilles semblaient être les plus aptes à remplir le cahier des charges d'une souche probiotique à visée bucco-dentaire.

L'objet principal de notre étude était donc d'identifier des souches probiotiques au sein de la collection des lactobacilles de l'UFR d'Odontologie de Bordeaux afin de proposer une nouvelle approche thérapeutique des principales maladies infectieuses de la cavité buccale. Cette recherche s'est intéressée principalement à la persistance dans la cavité buccale (via l'évaluation des propriétés d'adhérence) mais également l'effet inhibiteur envers différents pathogènes oraux.

Sur tube de verre, 10 souches ont montré des valeurs suffisantes pour être classées comme adhérentes. L'évaluation de l'hydrophobicité de ces 10 souches a permis de souligner les propriétés intéressantes de 3 d'entre elles. Ces trois lactobacilles appartiennent à une même espèce, *Lactobacillus gasseri*.

Les 10 lactobacilles les plus adhérents ont été évalués pour leur innocuité vis à vis du risque cariogène. Dans les conditions de notre étude, aucune des souches évaluées n'a montré un risque cariogène.

Pour conclure à une inhibition de certains pathogènes par nos lactobacilles, nous avons défini, en l'absence de référentiels précis, un diamètre seuil (25mm) en dessous duquel, nos souches n'étaient pas considérées comme inhibitrices. Au regard de cela, aucun lactobacille n'a eu d'effet inhibiteur caractéristique sur *Porphyromonas gingivalis*. 9 souches nous ont semblé d'intérêt, elles ont toutes inhibées nos pathogènes carieux (*Streptococcus mutans* et *Actinomyces viscosus*) et *Fusobacterium nucleatum*.

Malheureusement, parmi ces 9 lactobacilles nous n'avons pas retrouvé les 3 souches retenues pour leur capacité d'adhésion. Toutefois, certaines d'entre elles (22B, BAP3, BMS2, CJS1) ont adhéré correctement sur tube de verre.

Cette étude a souligné la difficulté de mettre en évidence des souches remplissant les exigences demandées à un probiotique oral. Les différents impératifs à atteindre nous amènent à considérer la possibilité d'associer des souches entre elles.

Avant de pouvoir proposer un produit adapté au maintien de la santé bucco-dentaire, d'autres tests semblent nécessaires.

L'évaluation de l'activité inhibitrice pourrait être élargie à d'autres pathogènes comme les espèces à croissance plus difficile *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* qui ont un rôle bien connu dans les maladies parodontales.

Des recherches devront être entreprises sur leur capacité à stimuler le système immunitaire en culture cellulaire et/ou avec un modèle animal.

Enfin, des précautions doivent être prises quant à l'utilisation des probiotiques en particulier chez les personnes immunodéprimés, c'est pourquoi une étape indispensable sera d'étudier leur sécurité relative avant de tenter des tests cliniques.

La valorisation de ce travail est en cours grâce à une collaboration avec des industriels.

Références

1. **Abee, T., T. R. Klaenhammer, and L. Letellier.** 1994. Kinetic studies of the action of lactacin F, a bacteriocin produced by Lactobacillus johnsonii that forms poration complexes in the cytoplasmic membrane. Appl Environ Microbiol **60:**1006-13.
2. **Absolom, D. R.** 1988. The role of bacterial hydrophobicity in infection: bacterial adhesion and phagocytic ingestion. Can J Microbiol **34:**287-98.
3. **Adams, C. A.** 2010. The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers. Nutr Res Rev **23:**37-46.
4. **Ahola, A. J., H. Yli-Knuuttila, T. Suomalainen, T. Poussa, A. Ahlstrom, J. H. Meurman, and R. Korpela.** 2002. Short-term consumption of probiotic-containing cheese and its effect on dental caries risk factors. Arch Oral Biol **47:**799-804.
5. **Ahumada, M. C., M. E. Colloca, M. E. Lopez, H. Pese de Ruiz, and M. E. Nader-Macias.** 1999. Characterization of Lactobacilli Isolated From The Tongue and Gum. Anaerobe **5:**129-135.
6. **Altenhoefer, A., S. Oswald, U. Sonnenborn, C. Enders, J. Schulze, J. Hacker, and T. A. Oelschlaeger.** 2004. The probiotic Escherichia coli strain Nissle 1917 interferes with invasion of human intestinal epithelial cells by different enteroinvasive bacterial pathogens. FEMS Immunol Med Microbiol **40:**223-9.
7. **Amrouche, T., Y. Boutin, G. Prioult, and I. Fliss.** 2006. Effects of bifidobacterial cytoplasm, cell wall and exopolysaccharide on mouse lymphocyte proliferation and cytokine production. Int Dairy J **16:**70-80.
8. **Antikainen, J., L. Anton, J. Sillanpaa, and T. K. Korhonen.** 2002. Domains in the S-layer protein CbsA of Lactobacillus crispatus involved in adherence to collagens, laminin and lipoteichoic acids and in self-assembly. Mol Microbiol **46:**381-94.
9. **Aragon, G., D. B. Graham, M. Borum, and D. B. Doman.** 2010. Probiotic therapy for irritable bowel syndrome. Gastroenterol Hepatol (N Y) **6:**39-44.
10. **Avila, M., D. M. Ojcius, and O. Yilmaz.** 2009. The oral microbiota: living with a permanent guest. DNA Cell Biol **28:**405-11.
11. **Axelsson, L. T., T. C. Chung, W. J. Dobrogosz, and S. E. Lindgren.** 1989. Production of a broad spectrum antimicrobial substance by Lactobacillus reuteri. Microb Ecology Health Dis **2:**131-136.
12. **Babbitt, P. C., M. S. Hasson, J. E. Wedekind, D. R. Palmer, W. C. Barrett, G. H. Reed, I. Rayment, D. Ringe, G. L. Kenyon, and J. A. Gerlt.** 1996. The enolase superfamily: a general strategy for enzyme-catalyzed abstraction of the alpha-protons of carboxylic acids. Biochemistry **35:**16489-501.
13. **Badet, C., and N. B. Thebaud.** 2008. Ecology of lactobacilli in the oral cavity: a review of literature. Open Microbiol J **2:**38-48.
14. **Balkus, J. E., C. Mitchell, K. Agnew, C. Liu, T. Fiedler, S. E. Cohn, A. Luque, R. Coombs, D. N. Fredricks, and J. Hitti.** 2012. Detection of hydrogen peroxide-producing Lactobacillus species in the vagina: a comparison of culture and quantitative PCR among HIV-1 seropositive women. BMC Infect Dis **12:**188.
15. **Banas, J. A.** 2004. Virulence properties of Streptococcus mutans. Front Biosci **9:**1267-77.
16. **Barber, J. M., F. T. Robb, J. R. Webster, and D. R. Woods.** 1979. Bacteriocin production by Clostridium acetobutylicum in an industrial fermentation process. Appl Environ Microbiol **37:**433-7.
17. **Barreau, G., T. A. Tompkins, and V. G. de Carvalho.** 2012. Draft genome sequence of probiotic strain Pediococcus acidilactici MA18/5M. J Bacteriol **194:**901.
18. **Bellon-Fontaine, M. N., J. Rault, and C. J. van Oss.** 1996. Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. Colloids Surf B Biointerfaces **7:**47-53.

19. **Benoit, V., A. Lebrihi, J. B. Milliere, and G. Lefebvre.** 1997. Purification and partial amino acid sequence of brevicin 27, a bacteriocin produced by Lactobacillus brevis SB27. Curr Microbiol **34:**173-9.
20. **Besselink, M. G., H. C. van Santvoort, E. Buskens, M. A. Boermeester, H. van Goor, H. M. Timmerman, V. B. Nieuwenhuijs, T. L. Bollen, B. van Ramshorst, B. J. Witteman, C. Rosman, R. J. Ploeg, M. A. Brink, A. F. Schaapherder, C. H. Dejong, P. J. Wahab, C. J. van Laarhoven, E. van der Harst, C. H. van Eijck, M. A. Cuesta, L. M. Akkermans, and H. G. Gooszen.** 2008. Probiotic prophylaxis in predicted severe acute pancreatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet **371:**651-9.
21. **Bibiloni, R., R. N. Fedorak, G. W. Tannock, K. L. Madsen, P. Gionchetti, M. Campieri, C. De Simone, and R. B. Sartor.** 2005. VSL#3 probiotic-mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis. Am J Gastroenterol **100:**1539-46.
22. **Boekhorst, J., Q. Helmer, M. Kleerebezem, and R. J. Siezen.** 2006. Comparative analysis of proteins with a mucus-binding domain found exclusively in lactic acid bacteria. Microbiology **152:**273-80.
23. **Bonifait, L., F. Chandad, and D. Grenier.** 2009. Probiotics for oral health: myth or reality? J Can Dent Assoc **75:**585-90.
24. **Bradshaw, D. J., P. D. Marsh, G. K. Watson, and C. Allison.** 1998. Role of Fusobacterium nucleatum and coaggregation in anaerobe survival in planktonic and biofilm oral microbial communities during aeration. Infect Immun **66:**4729-32.
25. **Buck, B. L., E. Altermann, T. Svingerud, and T. R. Klaenhammer.** 2005. Functional analysis of putative adhesion factors in Lactobacillus acidophilus NCFM. Appl Environ Microbiol **71:**8344-51.
26. **Burton, J. P., P. A. Wescombe, P. A. Cadieux, and J. R. Tagg.** 2011. Beneficial microbes for the oral cavity: time to harness the oral streptococci? Benef Microbes **2:**93-101.
27. **Busarcevic, M., and M. Dalgalarrondo.** 2012. Purification and genetic characterisation of the novel bacteriocin LS2 produced by the human oral strain Lactobacillus salivarius BGHO1. Int J Antimicrob Agents **40:**127-34.
28. **Busarcevic, M., M. Kojic, M. Dalgalarrondo, J. M. Chobert, T. Haertle, and L. Topisirovic.** 2008. Purification of bacteriocin LS1 produced by human oral isolate Lactobacillus salivarius BGHO1. Oral Microbiol Immunol **23:**254-8.
29. **Caglar, E., S. K. Cildir, S. Ergeneli, N. Sandalli, and S. Twetman.** 2006. Salivary mutans streptococci and lactobacilli levels after ingestion of the probiotic bacterium Lactobacillus reuteri ATCC 55730 by straws or tablets. Acta Odontol Scand **64:**314-8.
30. **Caglar, E., S. C. Kavaloglu, O. O. Kuscu, N. Sandalli, P. L. Holgerson, and S. Twetman.** 2007. Effect of chewing gums containing xylitol or probiotic bacteria on salivary mutans streptococci and lactobacilli. Clin Oral Investig **11:**425-9.
31. **Cannon, J. P., T. A. Lee, J. T. Bolanos, and L. H. Danziger.** 2005. Pathogenic relevance of Lactobacillus: a retrospective review of over 200 cases. Eur J Clin Microbiol Infect Dis **24:**31-40.
32. **Carlen, A., A. C. Borjesson, K. Nikdel, and J. Olsson.** 1998. Composition of pellicles formed in vivo on tooth surfaces in different parts of the dentition, and in vitro on hydroxyapatite. Caries Res **32:**447-55.
33. **Carpentier, B., and O. Cerf.** 1993. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. J Appl Bacteriol **75:**499-511.
34. **Cerning, J.** 1990. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol Rev **7:**113-30.
35. **Chanet, V., P. Brazille, S. Honore, M. Michel, A. Schaeffer, and V. Zarrouk.** 2007. Lactobacillus septic arthritis. South Med J **100:**531-2.

36. **Chapman, T. M., G. L. Plosker, and D. P. Figgitt.** 2006. VSL#3 probiotic mixture: a review of its use in chronic inflammatory bowel diseases. Drugs **66:**1371-87.
37. **Chardin, H., O. Barsotti, and M. Bonnaure-Mallet.** 2006. Microbiologie en odonto-stomatologie. Maloine, Paris.
38. **Chen, L., L. Ma, N. H. Park, and W. Shi.** 2001. Cariogenic actinomyces identified with a beta-glucosidase-dependent green color reaction to Gardenia jasminoides extract. J Clin Microbiol **39:**3009-12.
39. **Chervaux, C., C. Grimaldi, A. Bolotin, B. Quinquis, S. Legrain-Raspaud, J. E. van Hylckama Vlieg, G. Denariaz, and T. Smokvina.** 2011. Genome sequence of the probiotic strain Bifidobacterium animalis subsp. lactis CNCM I-2494. J Bacteriol **193:**5560-1.
40. **Chung, J., E. S. Ha, H. R. Park, and S. Kim.** 2004. Isolation and characterization of Lactobacillus species inhibiting the formation of Streptococcus mutans biofilm. Oral Microbiol Immunol **19:**214-6.
41. **Chung, T. C., L. Axelsson, S. E. Lindgren, and W. J. Dobrogosz.** 1989. In vitro studies on reuterin synthesis by Lactobacillus reuteri. Microb Ecology Health Dis **2:**137-144.
42. **Cildir, S. K., D. Germec, N. Sandalli, F. I. Ozdemir, T. Arun, S. Twetman, and E. Caglar.** 2009. Reduction of salivary mutans streptococci in orthodontic patients during daily consumption of yoghurt containing probiotic bacteria. Eur J Orthod **31:**407-11.
43. **Ciszek-Lenda, M., B. Nowak, M. Srottek, A. Gamian, and J. Marcinkiewicz.** 2011. Immunoregulatory potential of exopolysaccharide from Lactobacillus rhamnosus KL37: effects on the production of inflammatory mediators by mouse macrophages. Int J Exp Pathol **92:**382-91.
44. **Claesson, M. J., D. van Sinderen, and P. W. O'Toole.** 2007. The genus Lactobacillus--a genomic basis for understanding its diversity. FEMS Microbiol Lett **269:**22-8.
45. **Claisse, O., and A. Lonvaud-Funel.** 2001. Primers and a specific DNA probe for detecting lactic acid bacteria producing 3-hydroxypropionaldehyde from glycerol in spoiled ciders. J Food Prot **64:**833-7.
46. **Cleusix, V., C. Lacroix, S. Vollenweider, M. Duboux, and G. Le Blay.** 2007. Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by Lactobacillus reuteri against intestinal bacteria. BMC Microbiol **7:**101.
47. **Coccorullo, P., C. Strisciuglio, M. Martinelli, E. Miele, L. Greco, and A. Staiano.** 2010. Lactobacillus reuteri (DSM 17938) in infants with functional chronic constipation: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. J Pediatr **157:**598-602.
48. **Coconnier, M. H., T. R. Klaenhammer, S. Kerneis, M. F. Bernet, and A. L. Servin.** 1992. Protein-mediated adhesion of Lactobacillus acidophilus BG2FO4 on human enterocyte and mucus-secreting cell lines in culture. Appl Environ Microbiol **58:**2034-9.
49. **Coeuret, V., S. Dubernet, M. Bernardeau, M. Gueguen, and J.-P. Vernoux.** 2003. Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. Lait **83:**269-306.
50. **Comelli, E. M., B. Guggenheim, F. Stingele, and J. R. Neeser.** 2002. Selection of dairy bacterial strains as probiotics for oral health. Eur J Oral Sci **110:**218-24.
51. **Condon, S.** 1987. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. FEMS Microbiol Lett **46:**269-280.

52. **Conway, P. L., and S. Kjelleberg.** 1989. Protein-mediated adhesion of Lactobacillus fermentum strain 737 to mouse stomach squamous epithelium. J Gen Microbiol **135:**1175-86.
53. **Cukovic-Cavka, S., R. Likic, I. Francetic, N. Rustemovic, M. Opacic, and B. Vucelic.** 2006. Lactobacillus acidophilus as a cause of liver abscess in a NOD2/CARD15-positive patient with Crohn's disease. Digestion **73:**107-10.
54. **Cukrowska, B., R. LodInova-ZadnIkova, C. Enders, U. Sonnenborn, J. Schulze, and H. Tlaskalova-Hogenova.** 2002. Specific proliferative and antibody responses of premature infants to intestinal colonization with nonpathogenic probiotic E. coli strain Nissle 1917. Scand J Immunol **55:**204-9.
55. **Czerucka, D., T. Piche, and P. Rampal.** 2007. Review article: yeast as probiotics -- Saccharomyces boulardii. Aliment Pharmacol Ther **26:**767-78.
56. **Dahiya, R. S., and M. L. Speck.** 1968. Hydrogen peroxide formation by lactobacilli and its effect on Staphylococcus aureus. J Dairy Sci **51:**1568-72.
57. **Darveau, R. P., G. Hajishengallis, and M. A. Curtis.** 2012. Porphyromonas gingivalis as a Potential Community Activist for Disease. J Dent Res **91:**816-20.
58. **Dashper, S. G., and E. C. Reynolds.** 1990. Characterization of transmembrane movement of glucose and glucose analogs in Streptococcus mutants Ingbritt. J Bacteriol **172:**556-63.
59. **de Roissart, H., Luquet F.M.** 1994. Bactéries Lactiques : Aspects fondamentaux et technologiques, vol. 1. Lorica, Grenoble, France.
60. **de Vrese, M., and P. R. Marteau.** 2007. Probiotics and prebiotics: effects on diarrhea. J Nutr **137:**803S-11S.
61. **De Vuyst, L., and B. Degeest.** 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. FEMS Microbiol Rev **23:**153-77.
62. **Deepika, G., R. J. Green, R. A. Frazier, and D. Charalampopoulos.** 2009. Effect of growth time on the surface and adhesion properties of Lactobacillus rhamnosus GG. J Appl Microbiol **107:**1230-40.
63. **Deepika, G., E. Karunakaran, C. R. Hurley, C. A. Biggs, and D. Charalampopoulos.** 2012. Influence of fermentation conditions on the surface properties and adhesion of Lactobacillus rhamnosus GG. Microb Cell Fact **11:**116.
64. **Dewhirst, F. E., T. Chen, J. Izard, B. J. Paster, A. C. Tanner, W. H. Yu, A. Lakshmanan, and W. G. Wade.** 2010. The human oral microbiome. J Bacteriol **192:**5002-17.
65. **Diaz, P. I., N. I. Chalmers, A. H. Rickard, C. Kong, C. L. Milburn, R. J. Palmer, Jr., and P. E. Kolenbrander.** 2006. Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. Appl Environ Microbiol **72:**2837-48.
66. **Diaz, P. I., P. S. Zilm, and A. H. Rogers.** 2002. Fusobacterium nucleatum supports the growth of Porphyromonas gingivalis in oxygenated and carbon-dioxide-depleted environments. Microbiology **148:**467-72.
67. **Dortu, C., and P. Thonart.** 2009. Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. Biotechnol Agron Soc Environ **13:**143-154.
68. **Duary, R. K., Y. S. Rajput, V. K. Batish, and S. Grover.** 2011. Assessing the adhesion of putative indigenous probiotic lactobacilli to human colonic epithelial cells. Indian J Med Res **134:**664-71.
69. **Dunne, W. M., Jr.** 2002. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? Clin Microbiol Rev **15:**155-66.
70. **Eschenbach, D. A., P. R. Davick, B. L. Williams, S. J. Klebanoff, K. Young-Smith, C. M. Critchlow, and K. K. Holmes.** 1989. Prevalence of hydrogen peroxide-

producing Lactobacillus species in normal women and women with bacterial vaginosis. J Clin Microbiol **27:**251-6.

71. **Ewaschuk, J. B., H. Diaz, L. Meddings, B. Diederichs, A. Dmytrash, J. Backer, M. Looijer-van Langen, and K. L. Madsen.** 2008. Secreted bioactive factors from Bifidobacterium infantis enhance epithelial cell barrier function. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **295:**G1025-34.
72. **Ezendam, J., and H. van Loveren.** 2006. Probiotics: immunomodulation and evaluation of safety and efficacy. Nutr Rev **64:**1-14.
73. **Falentin, H., S. M. Deutsch, G. Jan, V. Loux, A. Thierry, S. Parayre, M. B. Maillard, J. Dherbecourt, F. J. Cousin, J. Jardin, P. Siguier, A. Couloux, V. Barbe, B. Vacherie, P. Wincker, J. F. Gibrat, C. Gaillardin, and S. Lortal.** 2010. The complete genome of Propionibacterium freudenreichii CIRM-BIA1, a hardy actinobacterium with food and probiotic applications. PLoS One **5:**e11748.
74. **Fleming, H. P., J. L. Etchells, and R. N. Costilow.** 1975. Microbial inhibition by an isolate of pediococcus from cucumber brines. Appl Microbiol **30:**1040-2.
75. **Foligne, B., J. Dewulf, J. Breton, O. Claisse, A. Lonvaud-Funel, and B. Pot.** 2010. Probiotic properties of non-conventional lactic acid bacteria: immunomodulation by Oenococcus oeni. Int J Food Microbiol **140:**136-45.
76. **Fotiadis, C. I., C. N. Stoidis, B. G. Spyropoulos, and E. D. Zografos.** 2008. Role of probiotics, prebiotics and synbiotics in chemoprevention for colorectal cancer. World J Gastroenterol **14:**6453-7.
77. **Fradiani, P. A., A. Petrucca, F. Ascenzioni, G. Di Nucci, A. Teggi, S. Bilancini, and P. Cipriani.** 2010. Endocarditis caused by Lactobacillus jensenii in an immunocompetent patient. J Med Microbiol **59:**607-9.
78. **Franks, I.** 2010. Pediatrics: Probiotics reduce the risk of necrotizing enterocolitis. Nat Rev Gastroenterol Hepatol **7:**358.
79. **Franz, C. M., M. Huch, H. Abriouel, W. Holzapfel, and A. Galvez.** 2011. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. Int J Food Microbiol **151:**125-40.
80. **Frece, J., B. Kos, J. Beganović, S. Vukovićet, and J. Šušković.** 2005. In vivo Testing of Functional Properties of Three Selected Probiotic Strains. World Journal of Microbiology and Biotechnology **21:**1401-1408.
81. **Gao, Y., Y. Lu, K. L. Teng, M. L. Chen, H. J. Zheng, Y. Q. Zhu, and J. Zhong.** 2011. Complete genome sequence of Lactococcus lactis subsp. lactis CV56, a probiotic strain isolated from the vaginas of healthy women. J Bacteriol **193:**2886-7.
82. **Gaussen, J.-L.** 2008. Recherche de probiotiques pour la santé bucco-dentaire : identification de lactobacilles salivaires par PCR-DGGE. Thèse pour le diplome d'état de Docteur en Chirurgie Dentaire. Université Bordeaux 2 - Victor Segalen, Bordeaux.
83. **Ghadimi, D., R. Folster-Holst, M. de Vrese, P. Winkler, K. J. Heller, and J. Schrezenmeir.** 2008. Effects of probiotic bacteria and their genomic DNA on TH1/TH2-cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of healthy and allergic subjects. Immunobiology **213:**677-92.
84. **Ghannoum, M. A., R. J. Jurevic, P. K. Mukherjee, F. Cui, M. Sikaroodi, A. Naqvi, and P. M. Gillevet.** 2010. Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. PLoS Pathog **6:**e1000713.
85. **Gilliland, S. E., and H. S. Kim.** 1984. Effect of viable starter culture bacteria in yogurt on lactose utilization in humans. J Dairy Sci **67:**1-6.
86. **Goldberg, S., A. Kozlovsky, D. Gordon, I. Gelernter, A. Sintov, and M. Rosenberg.** 1994. Cadaverine as a putative component of oral malodor. J Dent Res **73:**1168-72.

87. **Gomes, B. C., M. R. Rodrigues, L. K. Winkelstroter, A. Nomizo, and E. C. de Martinis.** 2012. In vitro evaluation of the probiotic potential of bacteriocin producer Lactobacillus sakei 1. J Food Prot **75:**1083-9.
88. **Granato, D., F. Perotti, I. Masserey, M. Rouvet, M. Golliard, A. Servin, and D. Brassart.** 1999. Cell surface-associated lipoteichoic acid acts as an adhesion factor for attachment of Lactobacillus johnsonii La1 to human enterocyte-like Caco-2 cells. Appl Environ Microbiol **65:**1071-7.
89. **Guarner, F., and G. J. Schaafsma.** 1998. Probiotics. Int J Food Microbiol **39:**237-8.
90. **Guggenheim, B., E. Giertsen, P. Schupbach, and S. Shapiro.** 2001. Validation of an in vitro biofilm model of supragingival plaque. J Dent Res **80:**363-70.
91. **Guinane, C. M., P. D. Cotter, C. Hill, and R. P. Ross.** 2005. Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. J Appl Microbiol **98:**1316-25.
92. **Hamada, S., and H. D. Slade.** 1980. Biology, immunology, and cariogenicity of Streptococcus mutans. Microbiol Rev **44:**331-84.
93. **Hamada, S., and M. Torii.** 1978. Effect of sucrose in culture media on the location of glucosyltransferase of Streptococcus mutans and cell adherence to glass surfaces. Infect Immun **20:**592-9.
94. **Hannig, C., M. Hannig, and T. Attin.** 2005. Enzymes in the acquired enamel pellicle. Eur J Oral Sci **113:**2-13.
95. **Harding, L. P., V. M. Marshall, Y. Hernandez, Y. Gu, M. Maqsood, N. McLay, and A. P. Laws.** 2005. Structural characterisation of a highly branched exopolysaccharide produced by Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus NCFB2074. Carbohydr Res **340:**1107-11.
96. **Hata, T., R. Tanaka, and S. Ohmomo.** 2010. Isolation and characterization of plantaricin ASM1: a new bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum A-1. Int J Food Microbiol **137:**94-9.
97. **Haukioja, A., E. Soderling, and J. Tenovuo.** 2008. Acid production from sugars and sugar alcohols by probiotic lactobacilli and bifidobacteria in vitro. Caries Res **42:**449-53.
98. **Haukioja, A., H. Yli-Knuuttila, V. Loimaranta, K. Kari, A. C. Ouwehand, J. H. Meurman, and J. Tenovuo.** 2006. Oral adhesion and survival of probiotic and other lactobacilli and bifidobacteria in vitro. Oral Microbiol Immunol **21:**326-32.
99. **Hedberg, M., P. Hasslof, I. Sjostrom, S. Twetman, and C. Stecksen-Blicks.** 2008. Sugar fermentation in probiotic bacteria--an in vitro study. Oral Microbiol Immunol **23:**482-5.
100. **Henriksson, A., and P. L. Conway.** 1996. Adhesion of Lactobacillus fermentum 104-S to porcine stomach mucus. Curr Microbiol **33:**31-4.
101. **Husni, R. N., S. M. Gordon, J. A. Washington, and D. L. Longworth.** 1997. Lactobacillus bacteremia and endocarditis: review of 45 cases. Clin Infect Dis **25:**1048-55.
102. **Hynonen, U., B. Westerlund-Wikstrom, A. Palva, and T. K. Korhonen.** 2002. Identification by flagellum display of an epithelial cell- and fibronectin-binding function in the SlpA surface protein of Lactobacillus brevis. J Bacteriol **184:**3360-7.
103. **Im, E., and C. Pothoulakis.** 2010. [Recent advances in Saccharomyces boulardii research]. Gastroenterol Clin Biol **34 Suppl 1:**S62-70.
104. **Iniesta, M., D. Herrera, E. Montero, M. Zurbriggen, A. R. Matos, M. J. Marin, M. C. Sanchez-Beltran, A. Llama-Palacio, and M. Sanz.** 2012. Probiotic effects of orally administered Lactobacillus reuteri-containing tablets on the subgingival and salivary microbiota in patients with gingivitis. A randomized clinical trial. J Clin Periodontol **39:**736-44.

105. **Ishibashi, N., and S. Yamazaki.** 2001. Probiotics and safety. Am J Clin Nutr **73:**465S-470S.
106. **Ishikawa, H., Y. Aiba, M. Nakanishi, Y. Oh-Hashi, and Y. Koga.** 2003. Suppression of Periodontal Pathogenic Bacteria in the Saliva of Humans by the Administration of Lactobacillus salivarius TI2711. Journal of the Japanese Association of Periodontology **45:**105-112.
107. **Ito, A., Y. Sato, S. Kudo, S. Sato, H. Nakajima, and T. Toba.** 2003. The screening of hydrogen peroxide-producing lactic acid bacteria and their application to inactivating psychrotrophic food-borne pathogens. Curr Microbiol **47:**231-6.
108. **Ivanova, I., V. Miteva, T. Stefanova, A. Pantev, I. Budakov, S. Danova, P. Moncheva, I. Nikolova, X. Dousset, and P. Boyaval.** 1998. Characterization of a bacteriocin produced by Streptococcus thermophilus 81. Int J Food Microbiol **42:**147-58.
109. **Jameson, J. E.** 1962. A discussion of the dynamics of Salmonella enrichment. J Hyg (Lond) **60:**193-207.
110. **Jay, J. M.** 1982. Antimicrobial properties of diacetyl. Appl Environ Microbiol **44:**525-32.
111. **Jensen, M. E., P. J. Polansky, and C. F. Schachtele.** 1982. Plaque sampling and telemetry for monitoring acid production on human buccal tooth surfaces. Arch Oral Biol **27:**21-31.
112. **Jijon, H., J. Backer, H. Diaz, H. Yeung, D. Thiel, C. McKaigney, C. De Simone, and K. Madsen.** 2004. DNA from probiotic bacteria modulates murine and human epithelial and immune function. Gastroenterology **126:**1358-73.
113. **Joerger, M. C., and T. R. Klaenhammer.** 1986. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by Lactobacillus helveticus 481. J Bacteriol **167:**439-46.
114. **Joerger, M. C., and T. R. Klaenhammer.** 1990. Cloning, expression, and nucleotide sequence of the Lactobacillus helveticus 481 gene encoding the bacteriocin helveticin J. J Bacteriol **172:**6339-47.
115. **Juarez Tomas, M. S., V. S. Ocana, B. Wiese, and M. E. Nader-Macias.** 2003. Growth and lactic acid production by vaginal Lactobacillus acidophilus CRL 1259, and inhibition of uropathogenic Escherichia coli. J Med Microbiol **52:**1117-24.
116. **Kang, H., H. S. Choi, J. E. Kim, and N. S. Han.** 2011. Exopolysaccharide-overproducing Lactobacillus paracasei KB28 induces cytokines in mouse peritoneal macrophages via modulation of NF-kappabeta and MAPKs. J Microbiol Biotechnol **21:**1174-8.
117. **Kang, M. S., J. Chung, S. M. Kim, K. H. Yang, and J. S. Oh.** 2006. Effect of Weissella cibaria isolates on the formation of Streptococcus mutans biofilm. Caries Res **40:**418-25.
118. **Kang, M. S., I. C. Kang, S. M. Kim, H. C. Lee, and J. S. Oh.** 2007. Effect of Leuconostoc spp. on the formation of Streptococcus mutans biofilm. J Microbiol **45:**291-6.
119. **Kang, M. S., J. S. Oh, H. C. Lee, H. S. Lim, S. W. Lee, K. H. Yang, N. K. Choi, and S. M. Kim.** 2011. Inhibitory effect of Lactobacillus reuteri on periodontopathic and cariogenic bacteria. J Microbiol **49:**193-9.
120. **Kankainen, M., L. Paulin, S. Tynkkynen, I. von Ossowski, J. Reunanen, P. Partanen, R. Satokari, S. Vesterlund, A. P. Hendrickx, S. Lebeer, S. C. De Keersmaecker, J. Vanderleyden, T. Hamalainen, S. Laukkanen, N. Salovuori, J. Ritari, E. Alatalo, R. Korpela, T. Mattila-Sandholm, A. Lassig, K. Hatakka, K. T. Kinnunen, H. Karjalainen, M. Saxelin, K. Laakso, A. Surakka, A. Palva, T. Salusjarvi, P. Auvinen, and W. M. de Vos.** 2009. Comparative genomic analysis of

Lactobacillus rhamnosus GG reveals pili containing a human- mucus binding protein. Proc Natl Acad Sci U S A **106:**17193-8.

121. **Kawai, Y., T. Saito, H. Kitazawa, and T. Itoh.** 1998. Gassericin A; an uncommon cyclic bacteriocin produced by Lactobacillus gasseri LA39 linked at N- and C-terminal ends. Biosci Biotechnol Biochem **62:**2438-40.
122. **Kawai, Y., T. Saito, M. Suzuki, and T. Itoh.** 1998. Sequence analysis by cloning of the structural gene of gassericin A, a hydrophobic bacteriocin produced by Lactobacillus gasseri LA39. Biosci Biotechnol Biochem **62:**887-92.
123. **Kelesidis, T., and C. Pothoulakis.** 2012. Efficacy and safety of the probiotic Saccharomyces boulardii for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders. Therap Adv Gastroenterol **5:**111-25.
124. **Khani, S., H. M. Hosseini, M. Taheri, M. R. Nourani, and A. A. Imani Fooladi.** 2012. Probiotics as an alternative strategy for prevention and treatment of human diseases: a review. Inflamm Allergy Drug Targets **11:**79-89.
125. **Kim, H. S., and S. E. Gilliland.** 1983. Lactobacillus acidophilus as a dietary adjunct for milk to aid lactose digestion in humans. J Dairy Sci **66:**959-66.
126. **Klaenhammer, T. R.** 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol Rev **12:**39-85.
127. **Kochan, P., A. Chmielarczyk, L. Szymaniak, M. Brykczynski, K. Galant, A. Zych, K. Pakosz, S. Giedrys-Kalemba, E. Lenouvel, and P. B. Heczko.** 2011. Lactobacillus rhamnosus administration causes sepsis in a cardiosurgical patient--is the time right to revise probiotic safety guidelines? Clin Microbiol Infect **17:**1589-92.
128. **Kolenbrander, P. E., and J. London.** 1993. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. J Bacteriol **175:**3247-52.
129. **Kostelc, J. G., P. R. Zelson, G. Preti, and J. Tonzetich.** 1981. Quantitative differences in volatiles from healthy mouths and mouths with periodontitis. Clin Chem **27:**842-5.
130. **Kotzamanidis, C., A. Kourelis, E. Litopoulou-Tzanetaki, N. Tzanetakis, and M. Yiangou.** 2010. Evaluation of adhesion capacity, cell surface traits and immunomodulatory activity of presumptive probiotic Lactobacillus strains. Int J Food Microbiol **140:**154-63.
131. **Kourelis, A., C. Kotzamanidis, E. Litopoulou-Tzanetaki, J. Papaconstantinou, N. Tzanetakis, and M. Yiangou.** 2010. Immunostimulatory activity of potential probiotic yeast strains in the dorsal air pouch system and the gut mucosa. J Appl Microbiol **109:**260-71.
132. **Kralj, S., G. H. van Geel-Schutten, M. M. Dondorff, S. Kirsanovs, M. J. van der Maarel, and L. Dijkhuizen.** 2004. Glucan synthesis in the genus Lactobacillus: isolation and characterization of glucansucrase genes, enzymes and glucan products from six different strains. Microbiology **150:**3681-90.
133. **Kralj, S., G. H. van Geel-Schutten, H. Rahaoui, R. J. Leer, E. J. Faber, M. J. van der Maarel, and L. Dijkhuizen.** 2002. Molecular characterization of a novel glucosyltransferase from Lactobacillus reuteri strain 121 synthesizing a unique, highly branched glucan with alpha-(1-->4) and alpha-(1-->6) glucosidic bonds. Appl Environ Microbiol **68:**4283-91.
134. **Kralj, S., G. H. van Geel-Schutten, M. J. E. C. van der Maarel, and L. Dijkhuizen.** 2003. Efficient screening methods for glucosyltransferase genes in Lactobacillus strains. Biocatalysis and Biotransformation **21:**181-187.
135. **Krasse, P., B. Carlsson, C. Dahl, A. Paulsson, A. Nilsson, and G. Sinkiewicz.** 2006. Decreased gum bleeding and reduced gingivitis by the probiotic Lactobacillus reuteri. Swed Dent J **30:**55-60.

136. **Kruis, W., S. Chrubasik, S. Boehm, C. Stange, and J. Schulze.** 2012. A double-blind placebo-controlled trial to study therapeutic effects of probiotic Escherichia coli Nissle 1917 in subgroups of patients with irritable bowel syndrome. Int J Colorectal Dis **27:**467-74.
137. **Kruis, W., P. Fric, J. Pokrotnieks, M. Lukas, B. Fixa, M. Kascak, M. A. Kamm, J. Weismueller, C. Beglinger, M. Stolte, C. Wolff, and J. Schulze.** 2004. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic Escherichia coli Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. Gut **53:**1617-23.
138. **Kumura, H., Y. Tanoue, M. Tsukahara, T. Tanaka, and K. Shimazaki.** 2004. Screening of dairy yeast strains for probiotic applications. J Dairy Sci **87:**4050-6.
139. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227:**680-5.
140. **Lebeer, S., J. Vanderleyden, and S. C. De Keersmaecker.** 2010. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. Nat Rev Microbiol **8:**171-84.
141. **Lee, K. W., J. Y. Park, H. R. Jeong, H. J. Heo, N. S. Han, and J. H. Kim.** 2012. Probiotic properties of Weissella strains isolated from human faeces. Anaerobe **18:**96-102.
142. **Leer, R. J., J. M. van der Vossen, M. van Giezen, J. M. van Noort, and P. H. Pouwels.** 1995. Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by Lactobacillus acidophilus. Microbiology **141 (Pt 7):**1629-35.
143. **Levri, K. M., K. Ketvertis, M. Deramo, J. H. Merenstein, and F. D'Amico.** 2005. Do probiotics reduce adult lactose intolerance? A systematic review. J Fam Pract **54:**613-20.
144. **Li, J., E. J. Helmerhorst, C. W. Leone, R. F. Troxler, T. Yaskell, A. D. Haffajee, S. S. Socransky, and F. G. Oppenheim.** 2004. Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. J Appl Microbiol **97:**1311-8.
145. **Lilly, D. M., and R. H. Stillwell.** 1965. Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. Science **147:**747-8.
146. **Lipinski, T., C. Jones, X. Lemercinier, A. Korzeniowska-Kowal, M. Strus, J. Rybka, A. Gamian, and P. B. Heczko.** 2003. Structural analysis of the Lactobacillus rhamnosus strain KL37C exopolysaccharide. Carbohydr Res **338:**605-9.
147. **Liu, C. F., K. C. Tseng, S. S. Chiang, B. H. Lee, W. H. Hsu, and T. M. Pan.** 2011. Immunomodulatory and antioxidant potential of Lactobacillus exopolysaccharides. J Sci Food Agric **91:**2284-91.
148. **Loe, H., E. Theilade, and S. B. Jensen.** 1965. Experimental Gingivitis in Man. J Periodontol **36:**177-87.
149. **Loesche, W. J., and C. Kazor.** 2002. Microbiology and treatment of halitosis. Periodontol 2000 **28:**256-79.
150. **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:**580-91.
151. **Makras, L., and L. De Vuyst.** 2006. The in vitro inhibition of Gram-negative pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids. Int Dairy J **16:**1049-1057.
152. **Mandel, I. D.** 1987. The function of saliva. J Dent Res **66:**623-627.
153. **Mantere-Alhonen, S.** 1995. Propionibacteria used as probiotics - A review. Lait **75:**447 - 452.
154. **Marciset, O., M. C. Jeronimus-Stratingh, B. Mollet, and B. Poolman.** 1997. Thermophilin 13, a nontypical antilisterial poration complex bacteriocin, that functions without a receptor. J Biol Chem **272:**14277-84.

155. **Marsh, P. D.** 2006. Dental plaque as a biofilm and a microbial community - implications for health and disease. BMC Oral Health **6 Suppl 1:**S14.
156. **Marsh, P. D.** 1994. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. Adv Dent Res **8:**263-71.
157. **Marsh, P. D., A. Moter, and D. A. Devine.** 2010. Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. Periodontol 2000 **55:**16-35.
158. **Marsh, P. D., and R. S. Percival.** 2006. The oral microflora--friend or foe? Can we decide? Int Dent J **56:**233-9.
159. **Marteau, P.** 2010. Probiotics in functional intestinal disorders and IBS: proof of action and dissecting the multiple mechanisms. Gut **59:**285-6.
160. **Marteau, P., B. Flourie, P. Pochart, C. Chastang, J. F. Desjeux, and J. C. Rambaud.** 1990. Effect of the microbial lactase (EC 3.2.1.23) activity in yoghurt on the intestinal absorption of lactose: an in vivo study in lactase-deficient humans. Br J Nutr **64:**71-9.
161. **Martin, R., M. Olivares, M. L. Marin, J. Xaus, L. Fernandez, and J. M. Rodriguez.** 2005. Characterization of a reuterin-producing Lactobacillus coryniformis strain isolated from a goat's milk cheese. Int J Food Microbiol **104:**267-77.
162. **Mattos-Graner, R. O., D. J. Smith, W. F. King, and M. P. Mayer.** 2000. Water-insoluble glucan synthesis by mutans streptococcal strains correlates with caries incidence in 12- to 30-month-old children. J Dent Res **79:**1371-7.
163. **McAuliffe, O., R. P. Ross, and C. Hill.** 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. FEMS Microbiol Rev **25:**285-308.
164. **McFarland, L. V.** 2010. Systematic review and meta-analysis of Saccharomyces boulardii in adult patients. World J Gastroenterol **16:**2202-22.
165. **McNamara, T. F., J. F. Alexander, and M. Lee.** 1972. The role of microorganisms in the production of oral malodor. Oral Surg Oral Med Oral Pathol **34:**41-8.
166. **Meurman, J. H.** 2005. Probiotics: do they have a role in oral medicine and dentistry? Eur J Oral Sci **113:**188-96.
167. **Meurman, J. H., and I. Stamatova.** 2007. Probiotics: contributions to oral health. Oral Dis **13:**443-51.
168. **Mollet, C., M. Drancourt, and D. Raoult.** 1997. rpoB sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. Mol Microbiol **26:**1005-11.
169. **Mukai, T., K. Arihara, and H. Itoh.** 1992. Lectin-like activity of Lactobacillus acidophilus strain JCM 1026. FEMS Microbiol Lett **77:**71-4.
170. **Mukasa, H., and H. D. Slade.** 1973. Mechanism of adherence of Streptococcus mutans to smooth surfaces. I. Roles of insoluble dextran-levan synthetase enzymes and cell wall polysaccharide antigen in plaque formation. Infect Immun **8:**555-62.
171. **Murchison, H., S. Larrimore, and R. Curtiss, 3rd.** 1981. Isolation and characterization of Streptococcus mutans mutants defective in adherence and aggregation. Infect Immun **34:**1044-55.
172. **Na, X., and C. Kelly.** 2011. Probiotics in clostridium difficile Infection. J Clin Gastroenterol **45 Suppl:**S154-8.
173. **Nakamura, S., T. Kuda, C. An, T. Kanno, H. Takahashi, and B. Kimura.** 2012. Inhibitory effects of Leuconostoc mesenteroides 1RM3 isolated from narezushi, a fermented fish with rice, on Listeria monocytogenes infection to Caco-2 cells and A/J mice. Anaerobe **18:**19-24.
174. **Nam, H., M. Ha, O. Bae, and Y. Lee.** 2002. Effect of Weissella confusa strain PL9001 on the adherence and growth of Helicobacter pylori. Appl Environ Microbiol **68:**4642-5.
175. **Nase, L., K. Hatakka, E. Savilahti, M. Saxelin, A. Ponka, T. Poussa, R. Korpela, and J. H. Meurman.** 2001. Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium,

Lactobacillus rhamnosus GG, in milk on dental caries and caries risk in children. Caries Res **35:**412-20.
176. **Navarre, W. W., and O. Schneewind.** 1994. Proteolytic cleavage and cell wall anchoring at the LPXTG motif of surface proteins in gram-positive bacteria. Mol Microbiol **14:**115-21.
177. **Navarre, W. W., and O. Schneewind.** 1999. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. Microbiol Mol Biol Rev **63:**174-229.
178. **Ng, S. C., A. L. Hart, M. A. Kamm, A. J. Stagg, and S. C. Knight.** 2009. Mechanisms of action of probiotics: recent advances. Inflamm Bowel Dis **15:**300-10.
179. **Nicolas, G. G., and M. C. Lavoie.** 2011. [Streptococcus mutans and oral streptococci in dental plaque]. Can J Microbiol **57:**1-20.
180. **Nyvad, B., and M. Kilian.** 1987. Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces in vivo. Scand J Dent Res **95:**369-80.
181. **O'Hanlon, D. E., T. R. Moench, and R. A. Cone.** 2011. In vaginal fluid, bacteria associated with bacterial vaginosis can be suppressed with lactic acid but not hydrogen peroxide. BMC Infect Dis **11:**200.
182. **Oho, T., Y. Yamashita, Y. Shimazaki, M. Kushiyama, and T. Koga.** 2000. Simple and rapid detection of Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus in human saliva by polymerase chain reaction. Oral Microbiol Immunol **15:**258-62.
183. **Ostengo Mdel, C., and M. Elena Nader-Macias.** 2004. Hydroxylapatite beads as an experimental model to study the adhesion of lactic acid bacteria from the oral cavity to hard tissues. Methods Mol Biol **268:**447-52.
184. **Otero, M. C., and M. E. Nader-Macias.** 2006. Inhibition of Staphylococcus aureus by H2O2-producing Lactobacillus gasseri isolated from the vaginal tract of cattle. Anim Reprod Sci **96:**35-46.
185. **Ou, C. C., S. L. Lin, J. J. Tsai, and M. Y. Lin.** 2011. Heat-killed lactic acid bacteria enhance immunomodulatory potential by skewing the immune response toward Th1 polarization. J Food Sci **76:**M260-7.
186. **Ouwehand, A. C., P. V. Kirjavainen, C. Shortt, and S. Salminen.** 1999. Probiotics: mechanisms and established effects. International Dairy Journal **9:**43-52.
187. **Palmer, R. J., Jr., S. M. Gordon, J. O. Cisar, and P. E. Kolenbrander.** 2003. Coaggregation-mediated interactions of streptococci and actinomyces detected in initial human dental plaque. J Bacteriol **185:**3400-9.
188. **Paster, B. J., I. Olsen, J. A. Aas, and F. E. Dewhirst.** 2006. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. Periodontol 2000 **42:**80-7.
189. **Pathmakanthan, S., C. K. Li, J. Cowie, and C. J. Hawkey.** 2004. Lactobacillus plantarum 299: beneficial in vitro immunomodulation in cells extracted from inflamed human colon. J Gastroenterol Hepatol **19:**166-73.
190. **Pelletier, C., C. Bouley, C. Cayuela, S. Bouttier, P. Bourlioux, and M. N. Bellon-Fontaine.** 1997. Cell surface characteristics of Lactobacillus casei subsp. casei, Lactobacillus paracasei subsp. paracasei, and Lactobacillus rhamnosus strains. Appl Environ Microbiol **63:**1725-31.
191. **Persson, S., M. B. Edlund, R. Claesson, and J. Carlsson.** 1990. The formation of hydrogen sulfide and methyl mercaptan by oral bacteria. Oral Microbiol Immunol **5:**195-201.
192. **Piard, J. C., and M. Desmazeaud.** 1991. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. Lait **71:**525-541.
193. **Polak, D., A. Wilensky, L. Shapira, A. Halabi, D. Goldstein, E. I. Weiss, and Y. Houri-Haddad.** 2009. Mouse model of experimental periodontitis induced by

Porphyromonas gingivalis/Fusobacterium nucleatum infection: bone loss and host response. J Clin Periodontol **36:**406-10.

194. **Pothoulakis, C.** 2009. Review article: anti-inflammatory mechanisms of action of Saccharomyces boulardii. Aliment Pharmacol Ther **30:**826-33.
195. **Prajapati, J. B., C. D. Khedkar, J. Chitra, S. Suja, V. Mishra, V. Sreeja, R. K. Patel, V. B. Ahir, V. D. Bhatt, M. R. Sajnani, S. J. Jakhesara, P. G. Koringa, and C. G. Joshi.** 2012. Whole-genome shotgun sequencing of Lactobacillus rhamnosus MTCC 5462, a strain with probiotic potential. J Bacteriol **194:**1264-5.
196. **Pretzer, G., J. Snel, D. Molenaar, A. Wiersma, P. A. Bron, J. Lambert, W. M. de Vos, R. van der Meer, M. A. Smits, and M. Kleerebezem.** 2005. Biodiversity-based identification and functional characterization of the mannose-specific adhesin of Lactobacillus plantarum. J Bacteriol **187:**6128-36.
197. **Pridmore, R. D., B. Berger, F. Desiere, D. Vilanova, C. Barretto, A. C. Pittet, M. C. Zwahlen, M. Rouvet, E. Altermann, R. Barrangou, B. Mollet, A. Mercenier, T. Klaenhammer, F. Arigoni, and M. A. Schell.** 2004. The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium Lactobacillus johnsonii NCC 533. Proc Natl Acad Sci U S A **101:**2512-7.
198. **Raibaud, P., M. Coulet, J. V. Galpin, and G. Mocquot.** 1961. Studies on the bacterial flora of the alimentary tract of pigs II. Streptococcus: selective enumeration and differentiation of the dominant group. J Appl Bacteriol **24:**285-306.
199. **Rautio, M., H. Jousimies-Somer, H. Kauma, I. Pietarinen, M. Saxelin, S. Tynkkynen, and M. Koskela.** 1999. Liver abscess due to a Lactobacillus rhamnosus strain indistinguishable from L. rhamnosus strain GG. Clin Infect Dis **28:**1159-60.
200. **Rembacken, B. J., A. M. Snelling, P. M. Hawkey, D. M. Chalmers, and A. T. Axon.** 1999. Non-pathogenic Escherichia coli versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. Lancet **354:**635-9.
201. **Riboulet-Bisson, E., M. H. Sturme, I. B. Jeffery, M. M. O'Donnell, B. A. Neville, B. M. Forde, M. J. Claesson, H. Harris, G. E. Gardiner, P. G. Casey, P. G. Lawlor, P. W. O'Toole, and R. P. Ross.** 2012. Effect of Lactobacillus salivarius bacteriocin Abp118 on the mouse and pig intestinal microbiota. PLoS One **7:**e31113.
202. **Richard, B., A. Groisillier, C. Badet, G. Dorignac, and A. Lonvaud-Funel.** 2001. Identification of salivary Lactobacillus rhamnosus species by DNA profiling and a specific probe. Res Microbiol **152:**157-65.
203. **Richter, V. J., and J. Tonzetich.** 1964. The Application of Instrumental Technique for the Evaluation of Odoriferous Volatiles from Saliva and Breath. Arch Oral Biol **9:**47-54.
204. **Riley, T. V., and B. J. Mee.** 1985. A comparative study of three bacteriocins of Bacteroides fragilis. Microbios **43:**115-33.
205. **Robin, F., C. Paillard, H. Marchandin, F. Demeocq, R. Bonnet, and C. Hennequin.** 2010. Lactobacillus rhamnosus meningitis following recurrent episodes of bacteremia in a child undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. J Clin Microbiol **48:**4317-9.
206. **Ronka, E., E. Malinen, M. Saarela, M. Rinta-Koski, J. Aarnikunnas, and A. Palva.** 2003. Probiotic and milk technological properties of Lactobacillus brevis. Int J Food Microbiol **83:**63-74.
207. **Roos, S., and H. Jonsson.** 2002. A high-molecular-mass cell-surface protein from Lactobacillus reuteri 1063 adheres to mucus components. Microbiology **148:**433-42.
208. **Rosenberg, M.** 2006. Microbial adhesion to hydrocarbons: twenty-five years of doing MATH. FEMS Microbiol Lett **262:**129-34.
209. **Rosenberg, M., H. Judes, and E. Weiss.** 1983. Cell surface hydrophobicity of dental plaque microorganisms in situ. Infect Immun **42:**831-4.

210. **Rosing, C. K., and W. Loesche.** 2011. Halitosis: an overview of epidemiology, etiology and clinical management. Braz Oral Res **25:**466-71.
211. **Rousseaux, C., X. Thuru, A. Gelot, N. Barnich, C. Neut, L. Dubuquoy, C. Dubuquoy, E. Merour, K. Geboes, M. Chamaillard, A. Ouwehand, G. Leyer, D. Carcano, J. F. Colombel, D. Ardid, and P. Desreumaux.** 2007. Lactobacillus acidophilus modulates intestinal pain and induces opioid and cannabinoid receptors. Nat Med **13:**35-7.
212. **Saito, A., S. Inagaki, R. Kimizuka, K. Okuda, Y. Hosaka, T. Nakagawa, and K. Ishihara.** 2008. Fusobacterium nucleatum enhances invasion of human gingival epithelial and aortic endothelial cells by Porphyromonas gingivalis. FEMS Immunol Med Microbiol **54:**349-55.
213. **Salminen, S., A. von Wright, L. Morelli, P. Marteau, D. Brassart, W. M. de Vos, R. Fonden, M. Saxelin, K. Collins, G. Mogensen, S. E. Birkeland, and T. Mattila-Sandholm.** 1998. Demonstration of safety of probiotics -- a review. Int J Food Microbiol **44:**93-106.
214. **Salvesen, I., and O. Vadstein.** 2000. Evaluation of plate count methods for determination of maximum specific growth rate in mixed microbial communities, and its possible application for diversity assessment. J Appl Microbiol **88:**442-8.
215. **Samot, J., J. Lebreton, and C. Badet.** 2011. Adherence capacities of oral lactobacilli for potential probiotic purposes. Anaerobe **17:**69-72.
216. **Sanders, M. E.** 2008. Probiotics: definition, sources, selection, and uses. Clin Infect Dis **46 Suppl 2:**S58-61; discussion S144-51.
217. **Schaefer, L., T. A. Auchtung, K. E. Hermans, D. Whitehead, B. Borhan, and R. A. Britton.** 2010. The antimicrobial compound reuterin (3-hydroxypropionaldehyde) induces oxidative stress via interaction with thiol groups. Microbiology **156:**1589-99.
218. **Schillinger, U., C. Guigas, and W. H. Holzapfel.** 2005. In vitro adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. Int Dairy J **15:**1289-1297.
219. **Schmidt, M., V. Maxime, F. Pareire, R. Carlier, C. Lawrence, B. Clair, and D. Annane.** 2011. A lethal case of meningitis due to Lactobacillus rhamnosus as a late complication of anterior cervical spine surgery. J Infect **62:**309-10.
220. **Schultz, M.** 2008. Clinical use of E. coli Nissle 1917 in inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis **14:**1012-8.
221. **Sengul, N., B. Aslim, G. Ucar, N. Yucel, S. Isik, H. Bozkurt, Z. Sakaogullari, and F. Atalay.** 2006. Effects of exopolysaccharide-producing probiotic strains on experimental colitis in rats. Dis Colon Rectum **49:**250-8.
222. **Servin, A. L.** 2004. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. FEMS Microbiol Rev **28:**405-40.
223. **SFM.** 2011. Recommandations 2011 du comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.
224. **Shimauchi, H., G. Mayanagi, S. Nakaya, M. Minamibuchi, Y. Ito, K. Yamaki, and H. Hirata.** 2008. Improvement of periodontal condition by probiotics with Lactobacillus salivarius WB21: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. J Clin Periodontol **35:**897-905.
225. **Sillanpaa, J., B. Martinez, J. Antikainen, T. Toba, N. Kalkkinen, S. Tankka, K. Lounatmaa, J. Keranen, M. Hook, B. Westerlund-Wikstrom, P. H. Pouwels, and T. K. Korhonen.** 2000. Characterization of the collagen-binding S-layer protein CbsA of Lactobacillus crispatus. J Bacteriol **182:**6440-50.
226. **Silva, M., N. V. Jacobus, C. Deneke, and S. L. Gorbach.** 1987. Antimicrobial substance from a human Lactobacillus strain. Antimicrob Agents Chemother **31:**1231-3.

227. **Slawik, S., I. Staufenbiel, R. Schilke, S. Nicksch, K. Weinspach, M. Stiesch, and J. Eberhard.** 2011. Probiotics affect the clinical inflammatory parameters of experimental gingivitis in humans. Eur J Clin Nutr **65:**857-63.
228. **Slots, J.** 1999. Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in periodontal disease: introduction. Periodontol 2000 **20:**7-13.
229. **Socransky, S. S., and S. D. Manganiello.** 1971. The oral microbiota of man from birth to senility. J Periodontol **42:**485-96.
230. **Soleman, N., H. Laferl, W. Kneifel, G. Tucek, E. Budschedl, H. Weber, H. Pichler, and H. K. Mayer.** 2003. How safe is safe?--a case of Lactobacillus paracasei ssp. paracasei endocarditis and discussion of the safety of lactic acid bacteria. Scand J Infect Dis **35:**759-62.
231. **Sougioultzis, S., S. Simeonidis, K. R. Bhaskar, X. Chen, P. M. Anton, S. Keates, C. Pothoulakis, and C. P. Kelly.** 2006. Saccharomyces boulardii produces a soluble anti-inflammatory factor that inhibits NF-kappaB-mediated IL-8 gene expression. Biochem Biophys Res Commun **343:**69-76.
232. **Spinler, J. K., M. Taweechotipatr, C. L. Rognerud, C. N. Ou, S. Tumwasorn, and J. Versalovic.** 2008. Human-derived probiotic Lactobacillus reuteri demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. Anaerobe **14:**166-71.
233. **Staab, B., S. Eick, G. Knofler, and H. Jentsch.** 2009. The influence of a probiotic milk drink on the development of gingivitis: a pilot study. J Clin Periodontol **36:**850-6.
234. **Stamatova, I., K. Kari, S. Vladimirov, and J. H. Meurman.** 2009. In vitro evaluation of yoghurt starter lactobacilli and Lactobacillus rhamnosus GG adhesion to saliva-coated surfaces. Oral Microbiol Immunol **24:**218-23.
235. **Stephan, R. M.** 1944. Intra-Oral Hydrogen-Ion Concentrations Associated With Dental Caries Activity. J Dent Res **23:**257-266.
236. **Strevett, K. A., and G. Chen.** 2003. Microbial surface thermodynamics and applications. Res Microbiol **154:**329-35.
237. **Strus, M., M. Brzychczy-Wloch, T. Gosiewski, P. Kochan, and P. B. Heczko.** 2006. The in vitro effect of hydrogen peroxide on vaginal microbial communities. FEMS Immunol Med Microbiol **48:**56-63.
238. **Svec, P., M. Kukletova, and I. Sedlacek.** 2010. Comparative evaluation of automated ribotyping and RAPD-PCR for typing of Lactobacillus spp. occurring in dental caries. Antonie Van Leeuwenhoek **98:**85-92.
239. **Szajewska, H., A. Horvath, and A. Piwowarczyk.** 2010. Meta-analysis: the effects of Saccharomyces boulardii supplementation on Helicobacter pylori eradication rates and side effects during treatment. Aliment Pharmacol Ther **32:**1069-79.
240. **Taipale, T., K. Pienihakkinen, S. Salminen, J. Jokela, and E. Soderling.** 2012. Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12 administration in early childhood: a randomized clinical trial of effects on oral colonization by mutans streptococci and the probiotic. Caries Res **46:**69-77.
241. **Takahashi, N.** 2003. Acid-neutralizing activity during amino acid fermentation by Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia and Fusobacterium nucleatum. Oral Microbiol Immunol **18:**109-13.
242. **Takahashi, N., and B. Nyvad.** 2011. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. J Dent Res **90:**294-303.
243. **Talarico, T. L., and W. J. Dobrogosz.** 1989. Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by Lactobacillus reuteri. Antimicrob Agents Chemother **33:**674-9.

244. **Tao, L., and J. M. Tanzer.** 2002. Novel sucrose-dependent adhesion co-factors in Streptococcus mutans. J Dent Res **81:**505-10.
245. **Teanpaisan, R., and G. Dahlen.** 2006. Use of polymerase chain reaction techniques and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for differentiation of oral Lactobacillus species. Oral Microbiol Immunol **21:**79-83.
246. **Teanpaisan, R., S. Piwat, and G. Dahlen.** 2011. Inhibitory effect of oral Lactobacillus against oral pathogens. Lett Appl Microbiol **53:**452-9.
247. **Tejero-Sarinena, S., J. Barlow, A. Costabile, G. R. Gibson, and I. Rowland.** 2012. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: Evidence for the effects of organic acids. Anaerobe **in press**.
248. **Testa, M. M., R. Ruiz de Valladares, and I. L. Benito de Cardenas.** 2003. Antagonistic interactions among Fusobacterium nucleatum and Prevotella intermedia with oral lactobacilli. Res Microbiol **154:**669-75.
249. **Teughels, W., M. Van Essche, I. Sliepen, and M. Quirynen.** 2008. Probiotics and oral healthcare. Periodontol 2000 **48:**111-47.
250. **Thygesen, J. B., H. Glerup, and B. Tarp.** 2012. Saccharomyces boulardii fungemia caused by treatment with a probioticum. BMJ Case Rep **2012**.
251. **Tichaczek, P. S., R. F. Vogel, and W. P. Hammes.** 1993. Cloning and sequencing of curA encoding curvacin A, the bacteriocin produced by Lactobacillus curvatus LTH1174. Arch Microbiol **160:**279-83.
252. **Todorov, S. D., M. Botes, S. T. Danova, and L. M. Dicks.** 2007. Probiotic properties of Lactococcus lactis ssp. lactis HV219, isolated from human vaginal secretions. J Appl Microbiol **103:**629-39.
253. **Tommasi, C., F. Equitani, M. Masala, M. Ballardini, M. Favaro, M. Meledandri, C. Fontana, P. Narciso, and E. Nicastri.** 2008. Diagnostic difficulties of Lactobacillus casei bacteraemia in immunocompetent patients: a case report. J Med Case Rep **2:**315.
254. **Ton-That, H., L. A. Marraffini, and O. Schneewind.** 2004. Protein sorting to the cell wall envelope of Gram-positive bacteria. Biochim Biophys Acta **1694:**269-78.
255. **Tong, Z., L. Dong, L. Zhou, R. Tao, and L. Ni.** 2010. Nisin inhibits dental caries-associated microorganism in vitro. Peptides **31:**2003-8.
256. **Tong, Z., L. Zhou, J. Li, R. Kuang, Y. Lin, and L. Ni.** 2012. An in vitro investigation of Lactococcus lactis antagonizing cariogenic bacterium Streptococcus mutans. Arch Oral Biol **57:**376-82.
257. **Tonzetich, J., and V. J. Richter.** 1964. Evaluation of Volatile Odoriferous Components of Saliva. Arch Oral Biol **9:**39-46.
258. **Twetman, S., B. Derawi, M. Keller, K. Ekstrand, T. Yucel-Lindberg, and C. Stecksen-Blicks.** 2009. Short-term effect of chewing gums containing probiotic Lactobacillus reuteri on the levels of inflammatory mediators in gingival crevicular fluid. Acta Odontol Scand **67:**19-24.
259. **Twomey, D., R. P. Ross, M. Ryan, B. Meaney, and C. Hill.** 2002. Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. Antonie Van Leeuwenhoek **82:**165-85.
260. **Untergasser, A., H. Nijveen, X. Rao, T. Bisseling, R. Geurts, and J. A. Leunissen.** 2007. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. Nucleic Acids Res **35:**W71-4.
261. **Valerio, F., F. Russo, S. de Candia, G. Riezzo, A. Orlando, S. L. Lonigro, and P. Lavermicocca.** 2010. Effects of probiotic Lactobacillus paracasei-enriched artichokes on constipated patients: a pilot study. J Clin Gastroenterol **44 Suppl 1:**S49-53.
262. **Van den Velde, S., D. van Steenberghe, P. Van Hee, and M. Quirynen.** 2009. Detection of odorous compounds in breath. J Dent Res **88:**285-9.

263. **van Essche, M., G. Loozen, C. Godts, N. Boon, M. Pauwels, M. Quirynen, and W. Teughels.** 2012. Bacterial Antagonism Against Periodontopathogens. J Periodontol.
264. **van Steenbergen, T. J., A. J. van Winkelhoff, and J. de Graaff.** 1984. Pathogenic synergy: mixed infections in the oral cavity. Antonie Van Leeuwenhoek **50:**789-98.
265. **Velez, M. P., S. C. De Keersmaecker, and J. Vanderleyden.** 2007. Adherence factors of Lactobacillus in the human gastrointestinal tract. FEMS Microbiol Lett **276:**140-8.
266. **Visser, M. B., and R. P. Ellen.** 2011. New insights into the emerging role of oral spirochaetes in periodontal disease. Clin Microbiol Infect **17:**502-12.
267. **Vollenweider, S., S. Evers, K. Zurbriggen, and C. Lacroix.** 2010. Unraveling the hydroxypropionaldehyde (HPA) system: an active antimicrobial agent against human pathogens. J Agric Food Chem **58:**10315-22.
268. **Vollenweider, S., and C. Lacroix.** 2004. 3-hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production. Appl Microbiol Biotechnol **64:**16-27.
269. **Voltan, S., I. Castagliuolo, M. Elli, S. Longo, P. Brun, R. D'Inca, A. Porzionato, V. Macchi, G. Palu, G. C. Sturniolo, L. Morelli, and D. Martines.** 2007. Aggregating phenotype in Lactobacillus crispatus determines intestinal colonization and TLR2 and TLR4 modulation in murine colonic mucosa. Clin Vaccine Immunol **14:**1138-48.
270. **Wadstrom, T., K. Andersson, M. Sydow, L. Axelsson, S. Lindgren, and B. Gullmar.** 1987. Surface properties of lactobacilli isolated from the small intestine of pigs. J Appl Bacteriol **62:**513-20.
271. **Wallet, F., R. Dessein, S. Armand, and R. J. Courcol.** 2002. Molecular diagnosis of endocarditis due to Lactobacillus casei subsp. rhamnosus. Clin Infect Dis **35:**e117-9.
272. **Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier, and D. J. Lane.** 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J Bacteriol **173:**697-703.
273. **Williams, N. T.** 2010. Probiotics. Am J Health Syst Pharm **67:**449-58.
274. **Ximenez-Fyvie, L. A., A. D. Haffajee, and S. S. Socransky.** 2000. Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. J Clin Periodontol **27:**722-32.
275. **Zambon, J. J., and S. A. Kasprzak.** 1995. The microbiology and histopathology of human root caries. Am J Dent **8:**323-8.
276. **Ze-Ze, L., R. Tenreiro, A. Duarte, M. J. Salgado, J. Melo-Cristino, L. Lito, M. M. Carmo, S. Felisberto, and G. Carmo.** 2004. Case of aortic endocarditis caused by Lactobacillus casei. J Med Microbiol **53:**451-3.
277. **Zhu, Y., L. Xiao, D. Shen, and Y. Hao.** 2010. Competition between yogurt probiotics and periodontal pathogens in vitro. Acta Odontol Scand **68:**261-8.
278. **Zobell, C. E.** 1943. The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity. J Bacteriol **46:**39-56.

Annexes

Annexe 1: Composition des milieux liquides et gélosés utilisés 98
Annexe 2: Différentes conditions de PCR utilisées au cours de l'étude..... 101
Annexe 3: Composition des différents tampons..... 104
Annexe 4: Protocole de réalisation d'un SDS-PAGE..... 106
Annexe 5 : Détermination des amorces permettant l'amplification de la gasséricine A avec le logiciel en ligne primer3 108
Annexe 6: Comparaison à l'aide du logiciel BLAST de la séquence obtenue chez notre souche de *L. gasseri* et la séquence issue de *L. hilgardii* pour le gène GD 109
Annexe 7 : Caractéristiques de la séquence partielle de la glycérol déshydratase de la souche GVS2 déposée sur GenBank sous le numéro d'accès JX505431 110
Annexe 8 : Recherche de séquences homologues sur GenBank à l'aide du logiciel BLAST de la séquence obtenue chez notre souche RZD1 lors de la recherche pour les gènes de GTF 111
Annexe 9: Article publié..... 112
Annexe 10: Article sous presse..... 116

Annexe 1: Composition des milieux liquides et gélosés utilisés

Milieux liquides

Milieu FMM, pH 7.0 ± 0.2 (58)

KCl	3.73g/L
NaCl	0.29g/L
$MgSO_4$	0.24g/L
$MnCl_2$	0.25g/L
$(NH_4)_2SO_4$	1.06g/L
Thiamine	0.45mg/L
Niacine (acide nicotinique)	0.98mg/L

Milieu FUM, pH 7.1 ± 0.2 (90)

Tryptone	10g/l
Extrait de levure	5g/l
glucose	3g/L
Hémine	0.002 g/L
Ménadione	0.001 g/L
Hydrochlorure de cystéine	0.5 g/L
Dithiothreitol	0.1 g/L
NaCl	2.9 g/L
Na_2CO_3	0.5 g/L
KNO_3	1 g/L
K_2HPO_4	0.45 g/L
$(NH_4)_2SO_4$	0.9 g/L
$MgSO_4$	0.188 g/L
Sérum de voeu foetal	5% (v/v)

Milieu LAPTg, pH 6.5 ± 0.2 (198)

Peptone	15 g/l
Tryptone	10 g/l
Extrait de levure	10 g/l
Glucose	10 g/l
Tween 80	0.1% (v/v)

Milieu MRS, pH 6.5 ± 0.2 (BD Sciences)

Peptone de protéose n°3	10g/L
Extrait de boeuf	10g/L
Extrait de levure	5g/L
Dextrose	20g/L
Polysorbate 80	1g/L

Citrate d'ammonium	2g/L
Acétate de sodium	5g/L
Sulfate de magnésium	0.1g/L
Sulfate de manganèse	0.05g/L
Phosphate dipotassique	2g/L

Milieu TS, pH 7.3 ± 0.2 (Oxoid)

Digestion pancréatique de caséine	17g/L
Digestion enzymatique de graine de soja	3g/L
Chlorure de sodium	5g/L
Hydrogénophosphate dipotassique	2.5g/L
Glucose	2.5g/L

Milieu WCA, pH 7.1 ± 0.2 (Oxoid)

Tryptone	10g/L
Peptone de gélatine	10g/L
Extrait de levure	5g/L
Glucose	1g/L
Chlorure de sodium	5g/L
L-Arginine	1g/L
Pyruvate de sodium	1g/L
Ménadione	0.5mg/L
Hémine	5mg/L

Milieux gélosés

Gélose MRS, pH 6.5 ± 0.2 (BD Sciences)

Peptone de protéose n°3	10g/L
Extrait de boeuf	10g/L
Extrait de levure	5g/L
Dextrose	20g/L
Polysorbate 80	1g/L
Citrate d'ammonium	2g/L
Acétate de sodium	5g/L
Sulfate de magnésium	0.1g/L
Sulfate de manganèse	0.05g/L
Phosphate dipotassique	2g/L
Agar	15g/L

Gélose molle BHI (Oxoid) - Agar , pH 7.4 ± 0.2

Infusion déshydratée de cerveau	12.5g/L

Infusion déshydratée de coeur de boeuf	5g/L
Peptone de protéose	10g/L
Glucose	2g/L
Chlorure de sodium	5g/L
Phosphate disodique	2.5g/L
Agar	7g/L

Gélose Schaedler, pH 7.6 ± 0.2 (Biomérieux)

Digestion pancréatique de caséine	8.2g/L
Digestion peptidique de tissu animal	2.5g/L
Digestion papaïque de semoule de soja	1g/L
Glucose	5.8g/L
Extrait de levure	5g/L
Chlorure de sodium	1.7g/L
Phosphate bipotassique	0.8g/L
L-Cystine	0.4g/L
Hémine	0.01g/L
Vitamine K1	0.01g/L
Tris (hydroxyméthyl) aminométhane	3g/L
Agar	13.5g/L
Sang de mouton, défibriné	5%

Annexe 2: Différentes conditions de PCR utilisées au cours de l'étude.

RAPD - Identification lactobacilles

Amorces :

Sens : 5’- GATCATAAACAACTGGAT- 3’ (CIMA)

Antisens : 5' - GCAGCCGG - 3’ (98)

Taille de produits de PCR attendue : variable

RAPD - Réaction de PCR			
Etapes	Durée	Température	Répétition
Dénaturation	30 s	96°C	30
Hybridation	30 s	38°C	
Elongation	2 min	72°C	

RPOβ - Identification lactobacilles par DGGE

Amorces :

rpoβ1 : 5’-ATTGACCACTTGGGTAACCGTCG- 3’

rpoβ10 : 5' -ATCGATCACTTAGGCAATCGTCG- 3’

rpoβ2 : 5' -ACGATCACGGGTCAAACCACC- 3’

Taille de produits de PCR attendue : 336pb

RPOβ - Réaction de PCR			
Etapes	Durée	Température	Répétition
Dénaturation initiale	5 min	95°C	1
Dénaturation	60 s	95°C	25
Hybridation	60 s	59-->45°C	
Elongation	60 s	72°C	
Elongation finale	10 min	72°C	1

ADNr16S

Amorces :

Sens : 5’- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3’ (fD1)

Antisens : 5' - AAGGAGGTGATCCAGCC - 3’ (rD1)

Taille de produits de PCR attendue : 1500 pb (environ)

ADNr 16S - Réaction de PCR			
Etapes	Durée	Température	Répétition
Dénaturation	30 s	95°C	
Hybridation	30 s	55°C	30
Elongation	30 s	72°C	

Gasséricine A

Amorces :

Sens : 5'- TGGATTTCCTATGGGAGGAAG - 3' (gaaFor)

Antisens : 5' - TCTGTCTCCTAAGAAAAAGGCTAA - 3' (gaaRev)

Taille de produits de PCR attendue : 384 pb

Gassséricine A - Réaction de PCR			
Etapes	Durée	Température	Répétition
Dénaturation initiale	5 minutes	94°C	1
Dénaturation	30 s	94°C	
Hybridation	30 s	45°C	30
Elongation	60 s	72°C	
Elongation finale	10 minutes	72°C	1

Glycérol Déshydratase

Amorces

Sens : 5'-AARGAYAAHCCIGTICARATHGCIGC-3' (GD1)

Antisens : 5'-CCAIGGIGTRTCRTCICCRTCIGTRAAIAC-3' (GD2)

Taille de produits de PCR attendue : 279 pb

Glycérol déshydratase - Réaction de PCR			
Etapes	Durée	Température	Répétition
Dénaturation initiale	30 s	95°C	1
Dénaturation	30 s	95°C	
Hybridation	45 s	50°C	30
Elongation	60 s	72°C	
Elongation finale	5 minutes	72°C	1

Glucosyltransférases

Amorces

Sens : 5’-GAYAAYWSIAAYCCIRYIGTIC-3’ (DegFor)

Antisens : 5’-AAGCTGCCTTAAGGTAATCACT-3’ (GTFI-R)

Taille de produits de PCR attendue : 660 pb

GTF - Réaction de PCR			
Etapes	Durée	Température	Répétition
Dénaturation initiale	3 minutes	95°C	1
Dénaturation Hybridation Elongation	30 s 45 s 60 s	95°C 45°C 72°C	30
Elongation finale	2 minutes	72°C	1

Remarque : la séquence de l'amorce DegRev est la suivante :
5'-ADRTCICCRTARTAIAVIYKIG-3'

Correspondances des symboles

R = A+G	W = A+T
Y = C+T	H = A+T+C
M = A+C	B = G+T+C
K = G+T	D = G+A+T
S = G+C	V = G+A+C

I = Inosine

Pour l'ensemble des réactions de PCR, environ 100ng d'ADN génomique ont été amplifiés dans un volume réactionnel de 20µl à l'aide de 2.5U de *Taq* polymérase (Qiagen), 200µM de chaque dNTP avec 1µM de chaque amorce (exception faite des mélanges réactionnels visant à amplifier la séquence de la glycérol déshydratase où la quantité d'amorce GD1 est de 1,5µM).

Annexe 3: Composition des différents tampons.

Tampon PBS (pH =7± 0.2, 0.01M)

Solution 1 : KH_2PO_4 (pH = 4.3± 0.2, 0.01M)

KH_2PO_4 : 1.3609 g
Ajuster le volume final à un litre avec de l'eau milliQ

Solution 2 : K_2HPO_4 (pH = 8.6± 0.2, 0.01M)

K_2HPO_4 : 1.7418g
Ajuster le volume final à un litre avec de l'eau milliQ

On amène le pH à 7 en ajoutant la 1ère solution dans la 2ème et en les mélangeant. On surveille l'évolution du pH au pHmètre.

Tampon Tris-Borate-EDTA (TBE), pH = 8.0 ± 0.2

Tris : 109.026g
Acide Borique : 55.647g
Na_2, EDTA : 7.4448g
Ajuster le volume final à un litre avec de l'eau milliQ

Tampon Tris-Acétate-EDTA (TAE), pH = 8.0 ± 0.2

Tris : 48.45g
Na_2, EDTA : 3.7224g
Acide acétique absolu (= Acide acétique glacial) : 11.44 ml
Ajuster le volume final à un litre avec de l'eau milliQ

Tampon Tris 4X pour gel de séparation (1.5 M Tris HCl pH 8.8, 0.4% SDS)

Ajouter 36.4g de Tris en poudre à 110 ml d'eau MilliQ
Ajouter 8 ml de SDS à 10%
Ajuster le pH à 8.8 avec du HCl à 1 N
Ajuster le volume final à 200 ml avec de l'eau milliQ

Tampon Tris 4X pour gel d'alignement (0.5 M Tris HCl pH 6.8, 0.4% SDS)

Ajouter 12.12g de Tris en poudre à 110 ml d'eau MilliQ.
Ajouter 8 ml de SDS à 10%.
Ajuster le pH à 6.8 avec du HCl à 1 N.
Ajuster le volume final à 200 ml avec de l'eau milliQ.

Tampon de charge 4X

4ml de glycérol
2ml de 2-mercaptoéthanol
1.2g de SDS
5ml de tampon Tris 4X pour gel d'alignement
0.03g de bleu de bromophénol
Faire des aliquots de 1.5ml dans des tubes de micro-centrifugation. Conserver à -20°C.

Tampon de migration 4X Tris-glycine (réserve)

36g de Tris base
172.8g de glycine
Compléter jusqu'à 3L avec de l'eau milliQ

Tampon de migration 1X Tris-glycine-SDS

750ml de tampon 4X Tris-glycine de réserve
30ml de SDS à 10%
Compléter jusqu'à 3L avec de l'eau milliQ

Annexe 4: Protocole de réalisation d'un SDS-PAGE

Préparation des deux solutions de gels suivantes :

Un gel de séparation de 20%

Eau MilliQ	1ml
Solution d'acrylamide à 30%	10ml
Tampon Tris 4X pour gel de séparation	3.75ml
Solution d'ammonium persulfate à 10%	150µl
SDS 10%	150µl

au dernier moment, juste avant de couler le gel, on va rajouter 15µl de tétraméthyléthylènediamine (TEMED).

Remarque : les quantités sont données pour la préparation de 2 gels de séparation de 10x10cm et d'1mm d'épaisseur. Le pouvoir de séparation de notre gel a été déterminé en fonction du poids moléculaire de la gasséricine A que l'on cherchait à isoler.

Un gel de concentration de 3.5%

Eau MilliQ	6.8ml
Solution d'acrylamide à 30%	1.7ml
Tampon Tris 4X pour gel d'alignement	1.25ml
Solution d'ammonium persulfate à 10%	100µl
SDS 10%	100µl

au dernier moment, juste avant de couler le gel, on va ajouter 10µl de TEMED.

Avant de couler le gel de séparation entre les plaques de verre, insérer le peigne celles-ci et marquer un point sur les plaques de verre 1cm en dessous de l'endroit où s'arrêtent les dents du peigne. Cela indiquera le niveau de remplissage pour le gel de séparation.
Le gel de séparation est ensuite coulé. Il est ensuite recouvert très précautionneusement soit avec 1ml d'isobutanol, d'isopropanol ou d'eau milliQ et laissé à polymériser pendant environ 15 minutes. Une fois la prise du gel achevé, le liquide de recouvrement est éliminé et le gel est rincé avec de l'eau milliQ.

Le gel de concentration est alors coulé et le peigne est placé avec précaution en s'assurant qu'aucune bulle ne reste prise sous les dents du peigne ce qui empêcherait la progression de l'échantillon. Le gel de concentration est laissé à polymériser pendant environ 1h.

On procède ensuite au chargement des échantillons *(remarque : les instructions données ci-dessous sont pour des échantillons dénaturés).*

Le volume de l'échantillon dépend de la capacité des puits (ici 10µl). En utilisant un tube de micro-centrifugation, les échantillons de protéines sont mélangés au tampon de charge 4X puis chauffés au bain-marie ou avec un bloc de chauffage pendant 2min pour dénaturer les protéines. Les échantillons sont centrifugés dans une micro-centrifugeuse pendant 20 sec à 10000 g ; ils sont alors prêts à être chargés.

Des marqueurs* de poids moléculaire sont placés aux extrémités du gel pour indiquer la taille des bandes. La préparation des marqueurs se fait selon les recommandations des fabricants.

Les autres échantillons peuvent alors êtres chargés dans les puits à l'aide d'une micro-pipette en notant leur position.

Après remplissage du bac d'électrophorèse avec du tampon de migration 1X, la migration peut commencer (90-225V, 20-45mA).

Une fois, la migration électrophorétique terminée, le gel est placé 1h dans une solution déjà prête à l'emploi (EZ Blue® gel staining reagent, Sigma-Aldrich).

*Marqueurs de poids moléculaire utilisés

Color Burst™ MW 8000 - 220 000 Da (Sigma-Aldrich)

Color Marker Ultra-low range MW 1060 - 26600 Da (Sigma-Aldrich)

Annexe 5 : Détermination des amorces permettant l'amplification de la gasséricine A avec le logiciel en ligne primer3

```
No mispriming library specified
Using 1-based sequence positions
OLIGO            start  len      tm     gc%   any   3' seq
LEFT PRIMER        236   21   60.26   47.62  6.00  3.00
tggatttcctatgggaggaag
RIGHT PRIMER       619   24   58.02   37.50  6.00  1.00
tctgtctcctaagaaaaaggctaa
SEQUENCE SIZE: 660
INCLUDED REGION SIZE: 660

PRODUCT SIZE: 384, PAIR ANY COMPL: 6.00, PAIR 3' COMPL: 2.00
TARGETS (start, len)*: 262,276

    1 aagtattatacattatctgtataataggccctcaatttatattatttgtgactgcaaaaa

   61 acaatatgtatcagttggtgggttcgtttgttggaatagtatggttttcgtatatttttt

  121 ggtatatttttttcaaacaacataaaaaaatgtagtataccacttgtttattgatttatt

  181 aagggcttataatagtgatataatatttattacaaaaaggtacgtacactcgtaatggat
                                                              >>>>>

  241 ttcctatgggaggaagatactatggttactaagtacggacgtaatttaggtttgaacaag
      >>>>>>>>>>>>>>>>     ****************************************

  301 gtagagttgtttgcaatttgggcggttttagtagttgctcttttattgaccacagcgaac
      ************************************************************

  361 atttattggattgctgatcaattcgggattcatttagcgactggaacagcccgtaagtta
      ************************************************************

  421 ttagatgcaatggcttctggtgcctcattgggaactgcctttgctgctattttgggcgtg
      ************************************************************

  481 acattacctgcatgggctttggcagctgcaggagcattgggagcgactgcagcctagtga
      ********************************************************

  541 ttataaagctttatgaatagactattcaaaaaaggctaataggtattaatacctattagc
                                                              <<<<<

  601 ctttttcttaggagacagatttgattagaattaataacgtaaggatactaattccattag
      <<<<<<<<<<<<<<<<<<
```

Annexe 6: Comparaison à l'aide du logiciel BLAST de la séquence obtenue chez notre souche de *L. gasseri* et la séquence issue de *L. hilgardii* pour le gène GD

```
>gb|AY061969.1|  Lactobacillus hilgardii GldA (gldA), GldB (gldB), glycerol dehydratase
large subunit GldC (gldC), glycerol dehydratase medium
subunit GldD (gldD), glycerol dehydratase small subunit
GldE (gldE), GldG (gldG), and GldH (gldH) genes, complete cds;
and GldK (gldK) gene, partial cds
Length=7562

 Score =   215 bits (238),  Expect = 8e-53
 Identities = 184/227 (81%), Gaps = 0/227 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query  3     CGATCTGTTCCATAAACAGAAATTGTTTCAGCATAAGCAGTGAAACCACGCATTCCTAAA  62
             ||||| || |||||||| ||||| ||||| || || ||||||||||||||||| || |||
Sbjct  2605  CGATCAGTGCCATAAACTGAAATGGTTTCTGCGTATGCAGTGAAACCACGCATCCCCAAA  2546

Query  63    CTAACCTCTTCCCATTCCTCAACACACCACTCCCTAATCACACCCCCTCCCCCACTTTCT  122
             || || ||||||||||||||||| || || || ||||| || || || ||||| |||||
Sbjct  2545  CTGAGTTCTTCCGATTCCTCAACGGAACATTGTGTAATCACCCCTGGACGCCCCGTTTGC  2486

Query  123   GAGCCAACCATAATTGCAATTGCATTCATTGGTGCATATCGGGCAACGGCTGTCGTCGTC  102
             || |||||||| || | ||| |||||||| |||||||| || || || || ||||||||
Sbjct  2485  GAACCAACCATGATCGAAATAGCATTCATCGGTGCATAACGAGCGACTGCGGTCGTCGTT  2426

Query  183   TCTTGCTCAGGGAAGCCTCTTAAGGCTGCTTCAGCAGCATCAGCCGC  229
             || || || ||||| ||||| |  || ||||| ||||||||||| ||
Sbjct  2425  TCCTGTTCCGGGAATCCTCTAAGAGCAGCTTCTGCAGCATCAGCGGC  2379
```

Annexe 7 : Caractéristiques de la séquence partielle de la glycérol déshydratase de la souche GVS2 déposée sur GenBank sous le numéro d'accès JX505431

GenBank flat file:

```
LOCUS       JX505431               229 bp    DNA     linear   BCT 24-AUG-2012
DEFINITION  Lactobacillus gasseri strain GVS2 glycerol dehydratase (gdlG) gene, partial cds.
ACCESSION   JX505431
VERSION     JX505431
KEYWORDS    .
SOURCE      Lactobacillus gasseri
  ORGANISM  Lactobacillus gasseri
            Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Lactobacillaceae;
            Lactobacillus.
REFERENCE   1  (bases 1 to 229)
  AUTHORS   Badet,C.
  TITLE     Antibacterial activity of probiotic candidates for oral health
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 229)
  AUTHORS   Samot,J.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (26-JUL-2012) Microbiologie, Faculte d Oenologie -
            I.S.V.V., 210 Chemin de Lysotte, Villenave d Ornon, Bordeaux 33140,France
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..229
                     /organism="Lactobacillus gasseri"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="GVS2"
                     /db_xref="taxon:1596"
                     /PCR_primers="fwd_name: gd1, fwd_seq:
                     aargayaahccngtncarathgcncc, rev_name: gd2, rev_seq:
                     ccanggngtrtcrtcnccrtcngtraanac"
                     /note="Bordeaux Odontologie collection"
     gene            complement(<1..>229)
                     /gene="gdlG"
     CDS             complement(<1..>229)
                     /gene="gdlG"
                     /codon_start=1
                     /transl_table=11
                     /product="glycerol dehydratase"
                     /protein_id="AFQ37946"
                     /translation="AADAAEAALRGFPEQETTTAVARYAPMNAIAIMVGSQTGRPGVI
                     TQCSVEESEELSLGMRGFTAYAETISVYGTDR"
ORIGIN
        1 ctcgatctgt tccataaaca gaaattgttt cagcataagc agtgaaacca cgcattccta
       61 aactaagctc ttccgattcc tcaacagagc actgcgtaat gacacccggt cgcccagttt
      121 gtgagccaac cataattgca attgcattca ttggtgcata tcgggcaacg gctgtcgtcg
      181 tctcttgctc agggaagcct cttaaggctg cttcagcagc atcagccgc
//
```

Annexe 8 : Recherche de séquences homologues sur GenBank à l'aide du logiciel BLAST de la séquence obtenue chez notre souche RZD1 lors de la recherche pour les gènes de GTF

```
>dbj|AP011548.1| Lactobacillus rhamnosus ATCC 53103 DNA, complete genome
Length=3005051

 Features in this part of subject sequence:
   conserved hypothetical protein
   mandelate racemase/muconate lactonizing protein

 Score =   232 bits (256),  Expect = 2e-57
 Identities = 222/283 (78%), Gaps = 1/283 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query  44       AGATTGCTAAGTTCTTCTCCATAAAGGACCGCGCTTCGGCATTGAGTGCCACGATCACAA  103
                 |||| | || ||||  || |  ||||||||| |  ||||||||||     | ||  ||||
Sbjct  2719338  AGATAGTTATGTTCAACTACCAAAAGGACCGGGACTCGGCATTGATATGGATGAAGACAA  2719279

Query  104      AATTATAGATTGGGCCCAAGAATGGCCGGCTTGGAGCAATCCATCCTGGACTGGT-ATCA  162
                 ||||| |||   |||||||||| |   || ||||||||||||||||||||    | || |
Sbjct  2719278  AATTAAAGAGGTGGCCCAAGAAGGTTTGGTTTGGAGCAATCCATCCTGGAAGAATTATGA  2719219

Query  163      TGGCACTATTGCCCAATGTTAATCTTGCTTGGTTTGACACCAATCTGAGGAGGCGTTTGA  222
                 ||||||||||   | || || || ||||||||||||| ||||||||||||||||||||
Sbjct  2719218  TGGCACTATTGCAGAGTGGTAGTCGTGCTTGGTTTGACGCCAATCTGAGGAGGCGTTTGA  2719159

Query  223      AATGGAAAATGTGACGACGACCGCCACGTTGCTTGGTGGCTTACTTTACCTGGAATTTCT  282
                 ||||| | |||||| ||||||||| | ||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2719158  AATGGTAGATGTGATGACGACCGCGATGTTGCTTGGTGGCTTACTTTACCTGGAATTTCT  2719099

Query  283      GTTCCAACGCCCCCTCCAAATGGTGACCAACCCATCACAAATT  325
                 |   || || |  ||||||||    |||||  ||||| | |||
Sbjct  2719098  GCAGCAGCGGCAACTCCAAATCAAAACCAAGTCATCAAAGATT  2719056


>emb|FM179322.1| Lactobacillus rhamnosus GG whole genome sequence, strain GG (ATCC
53103)
Length=3010111

 Features in this part of subject sequence:
   Conserved protein
   Galactonate dehydratase

 Score =   232 bits (256),  Expect = 2e-57
 Identities = 222/283 (78%), Gaps = 1/283 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query  44       AGATTGCTAAGTTCTTCTCCATAAAGGACCGCGCTTCGGCATTGAGTGCCACGATCACAA  103
                 |||| | || ||||  || |  ||||||||| |  ||||||||||     | ||  ||||
Sbjct  2724368  AGATAGTTATGTTCAACTACCAAAAGGACCGGGACTCGGCATTGATATGGATGAAGACAA  2724309

Query  104      AATTATAGATTGGGCCCAAGAATGGCCGGCTTGGAGCAATCCATCCTGGACTGGT-ATCA  162
                 ||||| |||   |||||||||| |   || ||||||||||||||||||||    | || |
Sbjct  2724308  AATTAAAGAGGTGGCCCAAGAAGGTTTGGTTTGGAGCAATCCATCCTGGAAGAATTATGA  2724249

Query  163      TGGCACTATTGCCCAATGTTAATCTTGCTTGGTTTGACACCAATCTGAGGAGGCGTTTGA  222
                 ||||||||||   | || || || ||||||||||||| ||||||||||||||||||||
Sbjct  2724248  TGGCACTATTGCAGAGTGGTAGTCGTGCTTGGTTTGACGCCAATCTGAGGAGGCGTTTGA  2724189

Query  223      AATGGAAAATGTGACGACGACCGCCACGTTGCTTGGTGGCTTACTTTACCTGGAATTTCT  282
                 ||||| | |||||| ||||||||| | ||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2724188  AATGGTAGATGTGATGACGACCGCGATGTTGCTTGGTGGCTTACTTTACCTGGAATTTCT  2724129

Query  283      GTTCCAACGCCCCCTCCAAATGGTGACCAACCCATCACAAATT  325
                 |   || || |  ||||||||    |||||  ||||| | |||
Sbjct  2724128  GCAGCAGCGGCAACTCCAAATCAAAACCAAGTCATCAAAGATT  2724086
```

Annexe 9: Article publié.

Anaerobe 17 (2011) 69–72

Contents lists available at ScienceDirect

Anaerobe

journal homepage: www.elsevier.com/locate/anaerobe

Clinical Microbiology

Adherence capacities of oral lactobacilli for potential probiotic purposes

J. Samot [a,b,*], J. Lebreton [b], C. Badet [a,b]

[a] Univ. de Bordeaux, ISVV, EA 4577, Unité de recherche OENOLOGIE, 33882 Villenave d'Ornon, France
[b] Laboratoire de Microbiologie, UFR d'Odontologie, Université Bordeaux Segalen, 16 cours de la Marne, 33082 Bordeaux cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 24 January 2011
Received in revised form
14 March 2011
Accepted 6 April 2011
Available online 15 April 2011

Keywords:
Lactobacilli
Probiotics
Adherence
Oral cavity

ABSTRACT

The most abundantly used probiotic strains come from the genus *Lactobacillus* and only a few studies have investigated their role in oral health. Even if a positive correlation has been established between the saliva *Lactobacillus* count and dental caries, this genus is generally recognized as safe (GRAS). Moreover, lactobacilli could in some cases play a beneficial role by inhibiting the growth of some oral pathogenic bacteria. This activity could justify their use as probiotic. To establish the potential health benefit of probiotic candidates, appropriate *in vitro* tests are required, particularly on their adhesive capacity.

The aim of this work was to investigate the adhesive properties and surface characteristics of 70 oral lactobacilli that could be used as probiotics for oral health.

For this, three methods were used: biofilm formation on a glass surface and on saliva-coated hydroxyapatite discs and the microbial adhesion to solvent method.

The results of the biofilm formed on glass surface showed 13 strains with an adhesion score equal to or higher than 3. 57/70 (81%) of the tested lactobacilli did not form any biofilm on glass surfaces. All of the 13 strains formed biofilms on HA discs. Among these 13 strains, 10/13 (77%) showed low surface hydrophobicity (0–35%) and 3/13 (23%) showed medium hydrophobicity (36–70%). Some of the selected strains showed potentially useful adhesive capacity. This work paves the way for the selection of probiotics that could be used for oral health purposes with the aim to reduce carious risk.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Lactobacilli appear in the oral cavity during the first years of a child's life and are well known to play a significant role within the oral ecosystem [1,2]. While a correlation has been established between the saliva *Lactobacillus* count and dental caries [3–5], lactobacilli could also play a beneficial role in some cases by inhibiting either the growth of some pathogenic bacteria [6–10] or their adhesive ability, a major pathogenic factor [11]. Recently, Simark-Mattsson et al. demonstrated that oral lactobacilli, which are capable of inhibiting *Streptococcus mutans*, *in vitro*, occur naturally in healthy young subjects [12]. These properties could justify their use as probiotic.

Probiotics are live organisms that confer a health benefit to the host when administered in adequate amounts [13], the most abundantly used strains coming from the genus *Lactobacillus*. The role of probiotics in oral health has received little attention. Some authors showed that consumption of products containing probiotic lactobacilli can cause a significant reduction in cariogenic bacteria rates and in carious risk [14–16]. However, little is known about the probiotic properties of salivary lactobacilli [17]. In order to establish the potential health benefit of probiotic candidates, appropriate *in vitro* tests are required particularly on their adhesive capacity [13,18].

The aim of this work was to select strains of oral lactobacilli that could be used as probiotic for oral health. For this, we investigated the adhesive properties and surface characteristics of wild strains of salivary origin.

2. Materials and methods

2.1. Cells culture and growth conditions

Sixty-four wild strains of lactobacilli isolated from saliva of children and six lactobacilli strains from American Type Culture Collection (ATCC) were tested.

All strains were cultured in Man, Rogosa and Sharpe Medium (MRS) (Merck, France) and cryopreserved at −80 °C.

All wild strains were identified by PCR method, as previously described [19].

* Corresponding author. Laboratoire de Microbiologie, UFR d'Odontologie, Université Bordeaux Segalen, 16 cours de la Marne, 33082 Bordeaux cedex, France. Tel.: +33 5 57 57 30 15; fax: +33 5 57 57 30 10.
E-mail address: johan.samot@u-bordeaux2.fr (J. Samot).

1075-9964/$ – see front matter © 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.anaerobe.2011.04.001

Briefly, approximately 100 ng of genomic DNA were amplified with 2.5 U of *Taq* polymerase in a 50 μL reaction mixture using a primer (GATCATAAACAACTGGAT) targeting a conserved amino acid region of the *mleS* gene of *Lactococcus lactis* IL 1441 and the other primer was an arbitrary 8-mer (GCAGCCGG).

Moreover, the 16S DNA of the five most interesting strains was sequenced according to Weisburg et al. [20].

2.2. Adherence of cells on glass surface

To screen the 70 strains, adherence was first tested on glass surface.

This rapid test is derived from a method previously described with slight modifications [21,22].

Briefly, in a glass test tube, 500 μl of a bacterial suspension with an optical density (OD) measured at 650 nm = 0.1 ± 0.01 were grown in 10 ml of MRS broth with 1% (w/v) sucrose (Sigma Aldrich, France). After incubation at 37 °C, with an angle of 30° and for 48 h, adherence on glass tube was scored from 0 (no adherence) to 4 (firmly adherent) according to Murchinson et al. [23].

All determinations were performed in triplicate.

2.3. Saliva collection and adherence of cells to hydroxyapatite discs

2.3.1. Saliva collection

Unstimulated whole saliva was collected from healthy volunteers at least 1.5 h after eating, drinking, or toothcleaning. Informed consent was obtained before the collection began.

The saliva was collected into sterile tubes and clarified by centrifugation (16 000*g* for 30 min at 20 °C). The supernate was pasteurized (30 min, 65°C) and re-centrifuged in sterile tubes; the resulting supernate was dispensed into sterile tubes and stored at −20 °C. The efficacy of pasteurisation was assessed by plating saliva samples on blood agar aerobically and anaerobically.

Adherence of cells to hydroxyapatite discs was tested on the 13 strains exhibiting adherence properties on glass surfaces.

Biofilms were developed on hydroxyapatite (HA) discs (Clarkson Chromatography Products Inc, USA) coated with pasteurized human saliva (30 min at 65°C, performed for sterility).

The sterile 24-well cell culture plate containing in each well the HA coated disc and a mixture of 800 μl of saliva, 800 μl of Fluid Universal Medium (FUM) containing 0.15% (w/v) glucose and 0.15% (w/v) sucrose [24] and 200 μl of bacterial inoculum was incubated anaerobically at 37 °C for 48 h.

Then, HA discs were washed with physiological saline to remove poorly adherent bacteria. To harvest adherent cells, each disc was placed in a sterile plastic Petri plate, and its surfaces were scraped with a sterile dental root curette. The surface of the scraped disc and the Petri plate were rinsed with physiological saline serum (1000 μl). Aliquots of harvested biofilm were diluted and plated onto MRS agar (Merck, France). After 48 h of anaerobic incubation at 37 °C, colony-forming units (CFU) were counted. For triplicate discs, the CFU per population were averaged and subjected to logarithmic transformation.

2.4. Microbial adhesion to solvents

Microbial adhesion to solvents (MATS) was performed on the 13 most adhesive strains according to Bellon-Fontaine et al. [25]. This method is based on the comparison between microbial cell affinity to a monopolar solvent, here, highly pure chloroform (Sigma Aldrich, France) and an apolar solvent, here, hexadecan (Sigma Aldrich, France). Briefly, a suspension containing approximately 10^9 cells in 6 ml suspending liquid (potassium phosphate buffer at concentration of 0.01 mol/l and adjusted to pH 7) was vortex-mixed for 90 s with 1 ml of the solvent under investigation. The mixture was allowed to stand for 15 min to ensure complete separation of the two phases before a sample (5 ml) was carefully removed from the aqueous phase and the optical density measured at 400 nm.

The percentage of bound cells was calculated by percentage adherence $= (1 - A/A_0) \times 100$ where A_0 is the optical density (OD) measured at 400 nm of the bacterial suspension before mixing and A is the absorbance after mixing.

All determinations were performed in triplicate.

As previously described [26], strains were classified in three hydrophobicity groups:

- Low hydrophobicity group (0–35%),
- Medium hydrophobicity group (36–70%),
- High hydrophobicity group (71–100%).

3. Results

3.1. Adherence of cells on glass surface

Cell adherence on glass surface is shown in Table 1.

Among the 70 strains, 13 were scored 3 or 4, and 57 did not form any biofilm on glass surfaces.

3.2. Adherence of cells to hydroxyapatite discs

Cell adherence to hydroxyapatite discs is shown in Table 2.

Biofilms formed on HA discs were recovered for all the strains.

Table 1
Scores of biofilm formed on glass surface 0: no biofilm 1: non-adherent biofilm 2: weakly adherent biofilm 3: adherent biofilm 4: strongly adherent biofilm.

	Score 48 h		Score 48 h
L. rhamnosus ATCC 7469	0	RZD_2 (*L. paracasei*)	1
L. casei ATCC 393	0	BMS1 (*L. plantarum*)	0
L. plantarum ATCC 8014	0	GVD1 (*L. paracasei*)	0
L. brevis ATCC 14869	4	A20 (*L. acidophilus 1*)	0
L. fermentum ATCC 9338	3	A21 (*L. paracasei*)	0
L. buchneri ATCC 11305	3	A22 (*L. paracasei*)	0
BAP3 (*L. rhamnosus*)	3	A23 (*L. paracasei*)	0
BMS2 (*L. plantarum*)	3	C4 (*L. acidophilus 1*)	0
CJS1 (*L. paracasei*)	3	21C (*L. brevis*)	0
22A (*L. brevis*)	3	21D (*L. acidophilus 1*)	0
22B (*L. rhamnosus*)	3	27A (*L. rhamnosus*)	0
24B (*L. rhamnosus*)	3	29A (*L. rhamnosus*)	0
70A (*L. gasseri*)	3	32A (*L. brevis*)	0
78A (*L. gasseri*)	3	36B (*L. plantarum*)	0
101A (*L. gasseri*)	3	37A (*L. rhamnosus*)	0
GVS_2 (*L. gasseri*)	3	38A (*L. rhamnosus*)	0
A24 (*L. paracasei*)	2	40A (*L. paracasei*)	0
BRS1 (*L. rhamnosus*)	1	41A (*L. paracasei*)	0
B2 (*L. brevis*)	1	42A (*L. rhamnosus*)	0
B21 (*L. acidophilus 2*)	1	45A (*L. rhamnosus*)	0
B22 (*L. brevis*)	1	46A (*L. rhamnosus*)	0
21B (*L. brevis*)	1	47A (*L. acidophilus 1*)	0
23A (*L. brevis*)	1	48A (*L. brevis*)	0
23B (*L. brevis*)	1	51A (*L. paracasei*)	0
23C(*L. rhamnosus*)	1	52B (*L. paracasei*)	0
24A (*L. rhamnosus*)	1	53A (*L. paracasei*)	0
25A (*L. rhamnosus*)	1	54A (*L. paracasei*)	0
28A (*L. rhamnosus*)	1	55A (*L. brevis*)	0
31A (*L. brevis*)	1	56A (*L. brevis*)	0
33A (*L. rhamnosus*)	1	$57A_1$ (*L. brevis*)	0
34A (*L. rhamnosus*)	1	301 (*L. paracasei*)	0
35A (*L. rhamnosus*)	1	302 (*L. paracasei*)	0
GVS_3 (*L. rhamnosus*)	1	1002 (*L. paracasei*)	0
HFS_1 (*L. rhamnosus*)	1	GVD3 (*L. rhamnosus*)	0
RZD_1 (*L. rhamnosus*)	1	GVD_4 (*L. casei*)	0

Table 2
Adhesion of salivary lactobacilli on hydroxyapatite discs The CFU per population for triplicate discs were averaged and subjected to logarithmic transformation.

Strains	Log_{10} CFU/mm^2
L. brevis ATCC 14869	3.16
L. fermentum ATCC 9338	2.83
L. buchneri ATCC 11305	3.81
A24 (*L. paracasei*)	3.04
22A (*L. brevis*)	3.94
22B (*L. rhamnosus*)	2.23
CJS1 (*L. paracasei*)	3.26
BAP3 (*L. rhamnosus*)	2.58
BMS2 (*L. plantarum*)	2.67
GVS_2 (*L. gasseri*)	3.16
70A (*L. gasseri*)	2.22
78A (*L. gasseri*)	3.81
101A (*L. gasseri*)	2.53

Among the ATCC strains, *Lactobacillus buchneri* formed the most abundant biofilm.

Among the wild strains, 78A and 22A gave results similar to *L. buchneri*.

3.3. Microbial adhesion to solvents

The average percentages of hydrophobicity of the different strains tested are shown in Table 3.

10/13 strains (77%) showed low hydrophobicity.

3/13 strains (23%) showed moderate hydrophobicity.

All the tests performed here allow the selection of three wild lactobacilli strains of interest: GVS2, 70A and 78A.

4. Discussion

Several requirements have been proposed for novel probiotic strains [13]. To assess whether naturally occurring oral lactobacilli have probiotic properties, we tested strains isolated from children's saliva and identified in a previous work [27]. Their adhesive properties were investigated by using two methods: adhesion on a glass surface and on saliva-coated hydroxyapatite. Bacterial surface characteristics were investigated by evaluating bacterial surface hydrophobicity and Lewis acid/base properties.

Table 3
Percentage of hydrophobicity of the different strains tested.

Strains	Hydrophobicity			
		Average	SD	Hydrophobicity group
L. brevis 14869	Hexadecan	5.66	2.21	
	Chloroform	21.93	1.37	
L. fermentum 9338	Hexadecan	0.33	0.30	
	Chloroform	2.52	0.56	
L. buchneri 11305	Hexadecan	0.1	0.30	
	Chloroform	0.36	0.56	
A24 (*L. paracasei*)	Hexadecan	13.82	2.15	
	Chloroform	29.72	9.39	
22A (*L. brevis*)	Hexadecan	4.88	2.15	Low hydrophobicity
	Chloroform	7.63	3.10	
22B (*L. rhamnosus*)	Hexadecan	1.34	0.56	
	Chloroform	0.78	0.27	
CJS1 (*L. paracasei*)	Hexadecan	4.06	0.50	
	Chloroform	19.42	3.73	
BAP3 (*L. rhamnosus*)	Hexadecan	15.3	1.14	
	Chloroform	29.46	5.46	
BMS2 (*L. plantarum*)	Hexadecan	1.50	0.69	
	Chloroform	14.33	5.70	
101A (*L. gasseri*)	Hexadecan	18.35	5.09	
	Chloroform	38.95	11.12	
GVS_2 (*L. gasseri*)	Hexadecan	52.67	13.81	
	Chloroform	85.47	11.66	Medium hydrophobicity
70A (*L. gasseri*)	Hexadecan	45.73	20.40	
	Chloroform	52.83	7.22	
78A (*L. gasseri*)	Hexadecan	49.53	4.98	
	Chloroform	66.69	3.59	

The production of exopolysaccharides is a key factor in the adherence of dental biofilm. In the present study, the glass surface represented the hard surface of the tooth and adherence was mediated by glucan as in the *in vivo* situation. We were thus able to perform quick screening of the biofilm formation capacity of our strains.

Indeed, this model was recently validated for *S. mutans* [28–30]. Among some lactobacilli species, glucan production has been studied extensively in the food industry [31,32]. However, there are fewer studies concerning the exopolysaccharide production of oral lactobacilli [33–35]. Our results show that wild strains of salivary lactobacilli were able to produce polysaccharides that allow them to adhere to a glass surface, so we continued the study on the 13 most adhesive strains using an HA model. Although there were some differences between the composition of pellicle obtained on HA *in vivo* and *in vitro* [36], it seems to be a good model for oral adhesion, the crystalline structure of the hydroxyapatite resembling that of the dental enamel.

Our lactobacilli adhered to saliva-coated hydroxyapatite. These results agree with others that recently demonstrated that the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG can adhere to saliva-coated HA [37,38].

Bacterial surface hydrophobicity is a major adhesion mechanism in the mouth [39,40].

We used the MATS technique because it makes it possible to determine not only hydrophobicity but also the character electron donor or electron receptor (respectively Lewis base or acid) of the cell surface, which is another method to explore adhesion.

According to Ahumada [26], our strains show low to moderate hydrophobicity properties. Since these techniques were validated by other researchers to predict adhesive properties [40], these results could indicate that the isolated strains have moderate adhesion and colonization capacity with respect to oral hard tissues. However, some strains also showed high adherence scores for the monopolar solvent used in our study, i.e. chloroform. This high affinity for chloroform may be due to the basic properties (Lewis Base) of the bacterial cell. The basic character is probably related with the presence of a carboxylic group on the microbial surface [25].

Various mechanisms involved in bacterial adhesion have been explored here to allow the selection of three wild lactobacilli strains of interest: GVS2, 70A and 78A.

But the adhesion mechanisms discussed here are mainly related as mentioned above in adhesion to hard tissues. Adherence to oral epithelial cells may be allowed by the presence of adhesins or pili on the bacterial surface as is the case at the intestine or colon [37,41–43].

Due to the fact that several *Lactobacillus* species are normal hosts of human mucosa and a long history of use in food industry, the lactobacilli are generally recognized as safe (GRAS) organisms. But as they have been implicated in cases of systemic infections (endocarditis, bacteremia,…) [44–47], precautions should be taken concerning their use as probiotics particularly in immunocompromised individuals.

As it has been demonstrated the adhesion ability and other traits of lactobacilli such as hydrophobicity [48] and the production of exopolysaccharides [49] are involved in the modulation of host immune response, the next step in the selection of probiotic lactobacilli for oral health purposes will be to study their relative safety and their ability to stimulate the immune system.

Acknowledgement

The authors thank Dr Ray Cooke for revising this manuscript.

References

[1] Socransky SS, Manganiello SD. The oral microbiota of man from birth to senility. J Periodontol 1971;42:485–96.
[2] Straetemans MM, van Loveren C, de Soet JJ, de Graaff J, ten Cate JM. Colonization with mutants streptococci and lactobacilli and the caries experience of children after the age of five. J Dent Res 1998;77:1851–5.
[3] Beighton D, Adamson A, Rugg-Gunn A. Associations between dietary intake, dental caries experience and salivary bacterial levels in 12-year-old English schoolchildren. Arch Oral Biol 1996;41:271–80.
[4] Gabris K, Nagy G, Madlena M, Denes Z, Marton S, Keszthelyi G, et al. Associations between microbiological and salivary caries activity tests and caries experience in Hungarian adolescents. Caries Res 1999;33:191–5.
[5] Vadillo-Rodriguez V, Busscher HJ, van der Mei HC, de Vries J, Norde W. Role of lactobacillus cell surface hydrophobicity as probed by AFM in adhesion to surfaces at low and high ionic strength. Colloids Surf B Biointerfaces 2005;41: 33–41.
[6] Ahumada Mdel C, Bru E, Colloca ME, Lopez ME, Nader-Macias ME. Evaluation and comparison of lactobacilli characteristics in the mouths of patients with or without cavities. J Oral Sci 2003;45:1–9.
[7] Ishikawa H, Aiba Y, Nakanishi M, Oh-Haashi Y, Koga Y. Suppression of periodontal pathogenic bacteria in the saliva of human by the administration of *Lactobacillus salivarius* TI 2711. J Jap Soc Periodontol 2003;45:105–12.
[8] Koll-Klais P, Mandar R, Leibur E, Marcotte H, Hammarstrom L, Mikelsaar M. Oral lactobacilli in chronic periodontitis and periodontal health: species composition and antimicrobial activity. Oral Microbiol Immunol 2005;20:354–61.
[9] Michalek SM, Hirasawa M, Kiyono H, Ochiai K, McGhee JR. Oral ecology and virulence of *Lactobacillus casei* and *Streptococcus mutans* in gnotobiotic rats. Infect Immun 1981;33:690–6.
[10] Sookkhee S, Chulasiri M, Prachyabrued W. Lactic acid bacteria from healthy oral cavity of Thai volunteers: inhibition of oral pathogens. J Appl Microbiol 2001;90:172–9.
[11] Chung J, Ha ES, Park HR, Kim S. Isolation and characterization of *Lactobacillus* species inhibiting the formation of *Streptococcus mutans* biofilm. Oral Microbiol Immunol 2004;19:214–6.
[12] Simark-Mattsson C, Emilson CG, Hakansson EG, Jacobsson C, Roos K, Holm S. *Lactobacillus*-mediated interference of mutans streptococci in caries-free vs. caries-active subjects. Eur J Oral Sci 2007;115:308–14.
[13] FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food, joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food; 2002. London, Ontario, Canada.
[14] Ahola AJ, Yli-Knuuttila H, Suomalainen T, Poussa T, Ahlstrom A, Meurman JH, et al. Short-term consumption of probiotic-containing cheese and its effect on dental caries risk factors. Arch Oral Biol 2002;47:799–804.
[15] Nase L, Hatakka K, Savilahti E, Saxelin M, Ponka A, Poussa T, et al. Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in milk on dental caries and caries risk in children. Caries Res 2001;35:412–20.
[16] Petti S, Tarsitani G, D'Arca AS. A randomized clinical trial of the effect of yoghurt on the human salivary microflora. Arch Oral Biol 2001;46:705–12.
[17] Strahinic I, Busarcevic M, Pavlica D, Milasin J, Golic N, Topisirovic L. Molecular and biochemical characterizations of human oral lactobacilli as putative probiotic candidates. Oral Microbiol Immunol 2007;22:111–7.
[18] Otero MC, Ocana VS, Elena Nader-Macias M. Bacterial surface characteristics applied to selection of probiotic microorganisms. Methods Mol Biol 2004;268: 435–40.
[19] Richard B, Groisillier A, Badet C, Dorignac G, Lonvaud-Funel A. Identification of salivary *Lactobacillus rhamnosus* species by DNA profiling and a specific probe. Res Microbiol 2001;152:157–65.
[20] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J Bacteriol 1991;173:697–703.
[21] Hamada S, Torii M. Effect of sucrose in culture media on the location of glucosyltransferase of *Streptococcus mutans* and cell adherence to glass surfaces. Infect Immun 1978;20:592–9.
[22] Mukasa H, Slade HD. Mechanism of adherence of *Streptococcus mutans* to smooth surfaces. I. Roles of insoluble dextran–levan synthetase enzymes and cell wall polysaccharide antigen in plaque formation. Infect Immun 1973;8:555–62.
[23] Murchison H, Larrimore S, Curtiss 3rd R. Isolation and characterization of *Streptococcus mutans* mutants defective in adherence and aggregation. Infect Immun 1981;34:1044–55.
[24] Guggenheim B, Giertsen E, Schupbach P, Shapiro S. Validation of an in vitro biofilm model of supragingival plaque. J Dent Res 2001;80:363–70.
[25] Bellon-Fontaine MN, Rault J, van Oss CJ. Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid–base properties of microbial cells. Colloids Surf B Biointerfaces 1996;7: 47–53.
[26] Ahumada MC, Colloca ME, Lopez ME, Pese de Ruiz H, Nader-Macias ME. Characterization of lactobacilli isolated from the tongue and gum. Anaerobe 1999;5:129–35.
[27] Román-Méndez C, Badet C, Yáñez A, Dominguez ML, Giono S, Richard B, et al. Identification of oral strains of *Lactobacillus* species isolated from Mexican and French children. J Dent Oral Hyg 2009;1:9–16.
[28] Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol Rev 1980;44:331–84.
[29] Mattos-Graner RO, Smith DJ, King WF, Mayer MP. Water-insoluble glucan synthesis by mutans streptococcal strains correlates with caries incidence in 12- to 30-month-old children. J Dent Res 2000;79:1371–7.
[30] Tao L, Tanzer JM. Novel sucrose-dependent adhesion co-factors in *Streptococcus mutans*. J Dent Res 2002;81:505–10.
[31] Kralj S, van Geel-Schutten GH, Rahaoui H, Leer RJ, Faber EJ, van der Maarel MJ, et al. Molecular characterization of a novel glucosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* strain 121 synthesizing a unique, highly branched glucan with alpha-(1->4) and alpha-(1->6) glucosidic bonds. Appl Environ Microbiol 2002;68:4283–91.
[32] Kralj S, van Geel-Schutten GH, Dondorff MM, Kirsanovs S, van der Maarel MJ, Dijkhuizen L. Glucan synthesis in the genus *Lactobacillus*: isolation and characterization of glucan sucrase genes, enzymes and glucan products from six different strains. Microbiology 2004;150:3681–90.
[33] De Vuyst L, Degeest B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. FEMS Microbiol Rev 1999;23:153–77.
[34] Harding LP, Marshall VM, Hernandez Y, Gu Y, Maqsood M, McLay N, et al. Structural characterisation of a highly branched exopolysaccharide produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB2074. Carbohydr Res 2005; 340:1107–11.
[35] Lipinski T, Jones C, Lemercinier X, Korzeniowska-Kowal A, Strus M, Rybka J, et al. Structural analysis of the *Lactobacillus rhamnosus* strain KL37C exopolysaccharide. Carbohydr Res 2003;338:605–9.
[36] Carlen A, Borjesson AC, Nikdel K, Olsson J. Composition of pellicles formed in vivo on tooth surfaces in different parts of the dentition, and in vitro on hydroxyapatite. Caries Res 1998;32:447–55.
[37] Haukioja A, Yli-Knuuttila H, Loimaranta V, Kari K, Ouwehand AC, Meurman JH, et al. Oral adhesion and survival of probiotic and other lactobacilli and bifidobacteria in vitro. Oral Microbiol Immunol 2006;21:326–32.
[38] Stamatova I, Kari K, Vladimirov S, Meurman JH. *In vitro* evaluation of yoghurt starter lactobacilli and *Lactobacillus rhamnosus* GG adhesion to saliva-coated surfaces. Oral Microbiol Immunol 2009;24:218–23.
[39] Doyle RJ, Rosenberg M. Microbial cell surface hydrophobicity. Washington, DC: American Society for Microbiology Press; 1990.
[40] Rosenberg M, Judes H, Weiss E. Cell surface hydrophobicity of dental plaque microorganisms in situ. Infect Immun 1983;42:831–4.
[41] Lebeer S, Verhoeven TL, Perea Velez M, Vanderleyden J, De Keersmaecker SC. Impact of environmental and genetic factors on biofilm formation by the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. Appl Environ Microbiol 2007;73: 6768–75.
[42] Kankainen M, Paulin L, Tynkkynen S, von Ossowski I, Reunanen J, Partanen P, et al. Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human-mucus binding protein. Proc Natl Acad Sci U S A 2009; 106:17193–8.
[43] von Ossowski I, Reunanen J, Satokari R, Vesterlund S, Kankainen M, Huhtinen H, et al. Mucosal adhesion properties of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG SpaCBA and SpaFED pilin subunits. Appl Environ Microbiol 2010;76:2049–57.
[44] Apostolou E, Kirjavainen PV, Saxelin M, Rautelin H, Valtonen V, Salminen SJ, et al. Good adhesion properties of probiotics: a potential risk for bacteremia? FEMS Immunol Med Microbiol 2001;31:35–9.
[45] Kirjavainen PV, Tuomola EM, Crittenden RG, Ouwehand AC, Harty DW, Morris LF, et al. In vitro adhesion and platelet aggregation properties of bacteremia-associated lactobacilli. Infect Immun 1999;67:2653–5.
[46] Oakey HJ, Harty DW, Knox KW. Enzyme production by lactobacilli and the potential link with infective endocarditis. J Appl Bacteriol 1995;78:142–8.
[47] Harty DW, Oakey HJ, Patrikakis M, Hume EB, Knox KW. Pathogenic potential of lactobacilli. Int J Food Microbiol 1994;24:179–89.
[48] Pelletier C, Bouley C, Cayuela C, Bouttier S, Bourlioux P, Bellon-Fontaine MN. Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. Appl Environ Microbiol 1997;63:1725–31.
[49] Sengul N, Aslim B, Ucar G, Yucel N, Isik S, Bozkurt H, et al. Effects of exopolysaccharide-producing probiotic strains on experimental colitis in rats. Dis Colon Rectum 2006;49:250–8.

ARTICLE IN PRESS

Anaerobe xxx (2012) 1–5

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Anaerobe

journal homepage: www.elsevier.com/locate/anaerobe

Clinical microbiology

Antibacterial activity of probiotic candidates for oral health

J. Samot [a,*], C. Badet [a,b]

[a] UFR of Odontology, University Bordeaux Segalen, 16 cours de la Marne, 33082 Bordeaux cedex, France
[b] EA 4577, OENOLOGIE, ISVV, Chemin de Leysotte, 33882 Villenave d'Ornon, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 16 July 2012
Received in revised form
22 November 2012
Accepted 26 November 2012
Available online xxx

Keywords:
Lactobacillus
Oral diseases
Antibacterial
Probiotic

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the probiotic potential of autochthonous oral lactobacilli. For this, 66 strains were screened for antibacterial activity against two cariogenic strains (*Streptococcus mutans* and *Actinomyces viscosus*) and two periodontopathogenic strains (*Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis*).

The inhibitory activity was investigated with the agar overlay technique. Positive results led us to explore some mechanisms of action.

The ability to produce H_2O_2 and the glycerol dehydratase gene were searched among all the strains. The gassericin A gene was checked among the *Lactobacillus gasseri*.

All the tested strains inhibited *S. mutans* and *A. viscosus*; only one did not inhibited *F. nucleatum* and 52 strains inhibited slightly the growth of *P. gingivalis*. No inactivation of antibacterial activity was observed after treatment with proteinase K. The gene of the gassericin A was not found in any strain.

Only one strain showed a 275-bp amplicon corresponding to the Glycerol Dehydratase gene. This strain has been identified by DNA 16S sequencing as a *L. gasseri*.

Among the 66 tested strains, 7 produced hydrogen peroxide.

Our findings suggest that in addition to the previous results, some of the autochthonous oral lactobacilli tested could be considered as suitable probiotics.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Oral cavity is a very complex ecosystem harboring more than 700 bacterial species [1,2].

Pathologies such as dental caries or periodontitis may arise when an imbalance occurs among this ecosystem resulting in a decrease of the indigenous bacteria to the benefit of pathogenic strains. Some bacterial species are strongly linked to oral diseases. On one hand, *Streptococcus mutans* plays a major role in the initiation and the development of dental caries, but other species such as *Actinomyces viscosus* are also implicated in dental root lesions [3,4].

On the other hand, *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* are closely associated with various forms of periodontal diseases [5,6]. If *F. nucleatum* is the most abundant Gram-negative anaerobe in the sub-gingival plaque and plays an important role in its formation, *P. gingivalis* is also a major putative pathogenic bacterium that occurs in severe adult periodontitis and acute periodontal diseases [7,8]. In order to maintain the equilibrium of the oral ecosystem, bacterial competitiveness appears to be a smart way to fight against the establishment of a pathogenic flora and this competition may be allowed by probiotics.

Probiotics are live organisms that confer a health benefit to the host when administered in adequate amounts [9]. The most abundantly used probiotic strains come from the genus *Lactobacillus*, generally recognized as safe (GRAS).

In the past decades some authors have investigated the role of probiotics in the oral cavity. Consumption of products containing probiotic lactobacilli has been shown to reduce caries risk and oral carriage of mutant streptococci, but the tested species were ATCC strains or current commercial probiotic species (e.g. *Lactobacillus rhamnosus* GG) [10–14]. Moreover only few studies have been carried out on the effect of autochthonous oral strains of lactobacilli on species implicated in oral diseases [15–17]. The selection of strains from this complex ecosystem implies that several functional features have to be preliminarily *in vitro* investigated.

In a previous work we have already tested lactobacilli strains capable of adhesion on oral surfaces [18]. It has been shown that good antimicrobial properties of probiotic strains are necessary to eradicate or inhibit pathogenic bacteria. It is known for a long time that lactobacilli are capable of producing antibacterial substances. Lactobacilli can generate organic acids from carbohydrate fermentation

* Corresponding author. Tel.: +33 5 57 57 30 15; fax: +33 5 57 57 30 10.
E-mail address: johan.samot@u-bordeaux2.fr (J. Samot).

1075-9964/$ – see front matter © 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.11.007

Please cite this article in press as: Samot J, Badet C, Antibacterial activity of probiotic candidates for oral health, Anaerobe (2012), http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.11.007

which could interfere, *in vivo*, with the growth of surrounding microorganisms by lowering the pH of the ecosystem [19]. Additionally, some strains from various species produce hydrogen peroxide or bacteriocins which are well-recognized modes of bacterial antagonism [20–22]. In this current study, as Koll-Klais found that *Lactobacillus gasseri* was predominant in the oral cavity of healthy people [17], we focused on the research of gassericin A gene, a bacteriocin known to be produced by this species.

At last, some lactobacilli seem to be able to synthetize reuterin, a broad-spectrum antimicrobial compound derived from glycerol metabolism. Reuterin, highlighted by Axelsson et al., was first isolated from *L. reuteri* but could be produced by other lactobacilli [23,24]. Today the name reuterin is used as a synonym for the HPA system, and its research must go through the identification of the glycerol dehydratase, the enzyme necessary for the synthesis of the complex [25].

So in order to select putative probiotic candidates, the aim of this study was to screen salivary lactobacilli for inhibition of oral pathogens through antimicrobial activity. We also examined some mechanisms implicated in this property.

2. Materials and methods

2.1. Cells culture and growth conditions

Sixty-six oral lactobacilli strains used in this study (Table 1) were previously isolated and identified from human saliva [26]. Partial sequencing of the 16S-rDNA fragment was performed for some strains with uncertain identity according to Weisburg et al.[27]. All strains were cultured in Man, Rogosa and Sharpe Medium (MRS) (Fischer Scientific, Illkirch, France) at 37 °C before being stored at −80 °C.

Antibacterial activity was carried out on two cariogenic strains (*S. mutans* ATCC25175 and *A. viscosus* ATCC15987) and two periodontopathogenic strains (*P. gingivalis* ATCC33277 and *F. nucleatum* ATCC1095). All strains were cryo-preserved at −80 °C. *Actinomyces* and *Streptococcus* were cultured in Tryptic Soy broth (Oxoid, Dardilly, France) at 37 °C, and the anaerobes in Wilkins Chalgren Anaerobe broth (Oxoid, Dardilly, France).

2.2. Antimicrobial activity assay

The inhibitory activity of the tested strains was investigated with the agar overlay technique described by Fleming [28].

Briefly, the surface of MRS agar (Fischer Scientific, Illkirch, France) was spot inoculated with 2 μL of an overnight culture of the tested lactobacilli, beforehand adjusted to OD of 1.0 ± 0.02 at 550 nm (three spots per dish).

To allow colonies to develop, agar plates were incubated for 1 day at 37 °C in anaerobiosis conditions (Genbox Anaer, BioMérieux, Crapone, France). Then they were overlaid with 7 mL of Brain Heart Infusion (Oxoid, Dardilly, France) soft agar (0.75% agar), which had been seeded with 0.1 mL of the bacteria culture to be tested (OD of 1.0 ± 0.02 at 550 nm).

After 48 h culture at 37 °C in anaerobiosis, a clear zone around the lactobacilli colonies was recorded as positive inhibition.

Each experiment was repeated three times and the average of the inhibition diameter was assessed.

Moreover, in order to reveal if the antibacterial effect was due to a protein, a treatment with protease was tested. Briefly, 5 μl of a solution of proteinase K (0.2 mg mL^{-1}) (Sigma–Aldrich, St Quentin Fallavier, France) was put on each overnight grown spot and then overlaid with the seeded soft agar as previously described.

Table 1
Species of oral lactobacilli selected for antimicrobial testing.

Lactobacilli	
Fermentation type and species	Number of strains
Obligately homofermentative	
L. acidophilus	5
L. gasseri	4
Facultatively heterofermentative	
L. casei	1
L. paracasei	18
L. plantarum	3
L. rhamnosus	22
Obligately heterofermentative	
L. brevis	13

2.3. DNA extraction

DNA was isolated from each bacterial strain by using GenElute™ Bacterial Genomic DNA kit (Sigma–Aldrich, St Quentin Fallavier, France) according to the manufacturer's supplied protocol.

2.4. Gassericin A gene

The gene of gassericin A was searched using a PCR method.

It was targeted with the primers gaAFor (5′-tggatttcctatgggaggaag-3′) and gaaARev (5′-tctgtctcctaagaaaaaggctaa-3′) which were designed from *L. gasseri* LA39 gassericin A gene sequence (GenBank accession number AB007043) using the online software Primer3-Plus [29].

L. gasseri LA39 (Riken Bioresource center, Ibaraki, Japan) was used as positive control [30,31].

Approximately 100 ng of genomic DNA were amplified with 2.5 U of *Taq* polymerase (Qiagen, Courtaboeuf, France) in a 20-μL reaction mixture using a thermal cycler (Minicycler™, MJ Research). Conditions were a preincubation step at 94 °C (5 min) and then 30 cycles of 94 °C (30 s), 45 °C (30 s), and 72 °C (1 min) followed by a final step of elongation, 72 °C (5 min).

Ten microliters of each amplification mixture were loaded on a 1% (w/v) agarose gel stained with ethidium bromide (Sigma–Aldrich, St Quentin Fallavier, France). Electrophoresis was done at 150 V for 1 h.

2.5. Glycerol dehydratase gene

A screening of the glycerol dehydratase (GD) gene using the PCR method was made to search possible implication of reuterin as an antimicrobial compound.

2.5.1. PCR

According to Claisse and Lonvaud-Funel [32], two DNA primers GD1 (5′-aargayaahccigticarathgcigc-3′) and GD2 (5′-ccaiggigtrtcrtciccrtcigtraaiac-3′), chosen in the region encoding one of the subunits of glycerol dehydratase of *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella typhimurium*, and *Clostridium pasteurianum* were used. A 275-bp amplicon in polymerase chain reaction amplification was obtained with the genomic *Lactobacillus collinoides* IOEB 9527 DNA as template.

Approximately 100 ng of genomic DNA were amplified with 2.5 U of *Taq* polymerase (Qiagen, Courtaboeuf, France) in a 20 μL reaction mixture using a thermal cycler (Minicycler™ MJ Research). Conditions were a preincubation step at 95 °C (30 s) and then 40 cycles of 95 °C (30 s), 57 °C (30 s), and 72 °C (30 s) followed by a final step of elongation, 72 °C (10 min). Ten microliters of each amplification mixture were loaded on a 1% (w/v) agarose gel stained with ethidium bromide (Sigma–Aldrich, St Quentin Fallavier, France). Electrophoresis was done at 150 V for 1 h.

Please cite this article in press as: Samot J, Badet C, Antibacterial activity of probiotic candidates for oral health, Anaerobe (2012), http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.11.007

2.5.2. Sequencing

DNA fragments were extracted from agarose gels using S.N.A.P™ Gel Purification Kit (Invitrogen, Fischer Scientific, Illkirch, France) and reamplified before being sequenced. The amplified fragments were sequenced by Beckman Coulter Genomics (Grenoble, France). The primers described for PCR amplification were used for sequencing.

The sequences obtained were aligned in a sequence alignment editor, 'Bioedit' to look for any introduced errors while sequencing, if any. Finally, homology search was carried out using BLAST N version 2.2.6 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

2.6. Hydrogen peroxide production

Each strain of lactobacilli was tested for its ability to produce H_2O_2 according to the method initially described by Eschenbach and modified by Kang et al. [13,33]. Briefly, each strain was plated onto MRS agar supplemented with 0.25 mg mL^{-1} of TMB (3,3′,5,5′-tetramethylbenzidine) (Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France) and 0.01 mg mL^{-1} of peroxidase (Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France), and was incubated anaerobically for 48 h. Subsequently, each strain was exposed to the ambient air. Colonies showing a blue colour were considered H_2O_2 producers.

3. Results

3.1. Antimicrobial assay

The antibacterial activities of 66 salivary strains of lactobacilli against cariogenic (*S. mutans*, *A. viscosus*) and periodontopathogenic (*P. gingivalis*, *F. nucleatum*) bacteria were evaluated (Table 2).

The results of the agar overlay technique showed that all the tested lactobacilli strains had an antibacterial activity against *A. viscosus* and *S. mutans* over the 48 h time period.

Fifty-two strains inhibited slightly the growth of *P. gingivalis*, and only two had no activity on *F. nucleatum*.

The inhibitory zones for *S. mutans* ranged from 9 mm to 30 mm, for *A. viscosus* ranged from 18 mm to >40 mm, for *F. nucleatum* ranged from 15 mm to >40 mm and for *P. gingivalis* ranged from 7 mm to 18 mm.

No inactivation of antibacterial activity was observed after treatment with proteinase K.

Among all the tested lactobacilli strains, six harbored an interesting antibacterial activity (Table 3). They showed an antibacterial activity against the 4 putative pathogenic species with the highest diameter of inhibition. They were identified as *Lactobacillus plantarum* (BMS2), *Lactobacillus brevis* (22A, 31A, 57A1), *L. rhamnosus* (34A) and *Lactobacillus paracasei* (CJS1).

3.2. Gassericin A gene

No amplicon for any strain was present on the agarose gels.

The positive control (*L. gasseri* LA39) showed a 384-bp amplicon corresponding to the gassericin A gene (data not shown).

3.3. Glycerol dehydratase gene

Among the 66 tested strains only one showed a 275-bp amplicon corresponding to the glycerol dehydratase gene (Fig. 1). This strain (GVS2) did not belong to the most active strains.

GVS2 has been identified, by partial sequencing of the 16S-rDNA fragment, as *L. gasseri*.

The nucleotide sequences of the 275-bp amplicon obtained from sequencing were aligned with each other and corrected using BioEdit software. After correction and the removing of the areas too much uncertain, we obtained a sequence of 225-bp which could be compared to sequences available in GenBank using BLASTN software. This comparison showed that our sequence had 81% identity with the partial sequence of the region encoding the C subunit of glycerol dehydratase of *Lactobacillus hilgardii*. Our sequence has been annotated and deposited in Genbank under accession number JX505431.

3.4. Hydrogen peroxide production

Among the tested strains, only 7 (10.6%) were H_2O_2 producers.

They were identified as *L. gasseri* (101A), *L. paracasei* (A24), *L. brevis* (21C, 22A), *L. plantarum* (BMS1), and *L. acidophilus* (B21, 21D).

Among these H_2O_2 producers, *L. gasseri* (101A) showed a weak antibacterial activity against *S. mutans*, *A. viscosus* and *F. nucleatum*, and no effect against *P. gingivalis*.

The two strains of *L. acidophilus* (B21 and 21D) showed a low efficiency against *S. mutans* but inhibited the growth of *A. viscosus*. However, they presented different effects against the anaerobes; B21 was not active at all and 21D was able to inhibit strongly *F. nucleatum* and more weakly *P. gingivalis*.

The two *L. brevis* strains (21C and 22A) and *L. plantarum* (BMS1) inhibited all the tested strains.

Only one of the *L. brevis* strains (22A) belonged to the group of the six most active strains as regards to antibacterial activity.

4. Discussion

Dental caries and periodontitis are two common human infectious diseases. Recently, there has been increasing interest in

Table 2
Antimicrobial activity of oral lactobacilli expressed as inhibitory zone values (mm).

Lactobacilli	Inhibition of target bacteria: zone values (mm) mean ± SD							
Fermentation type/ species	*S. mutans*		*A. viscosus*		*F. nucleatum*		*P. gingivalis*	
	P−	P+	P−	P+	P−	P+	P−	P+
Obligately homofermentative								
L. acidophilus	16 ± 5.29	14.8 ± 5.12	31.4 ± 8.38	31.6 ± 8.53	28.8 ± 17.52	28.2 ± 17.78	3.8 ± 5.31	4 ± 5.66
L. gasseri	14.75 ± 4.57	15.25 ± 3.95	31.25 ± 10.18	30.75 ± 10.75	27.75 ± 14.15	27.50 ± 14.43	2.5 ± 5	2.5 ± 5
Facultatively heterofermentative								
L. casei	23	24	40	40	23	22	13	13
L. paracasei	20.44 ± 5.28	20.94 ± 5.06	35.22 ± 6.58	36.38 ± 5.64	35.44 ± 10.84	35.5 ± 10.86	9.5 ± 5.34	9.5 ± 5.36
L. plantarum	23.33 ± 4.16	24.66 ± 1.53	38.33 ± 1.53	37 ± 2.65	40 ± 0	40 ± 0	13.33 ± 2.31	12.66 ± 2.08
L. rhamnosus	22.90 ± 2.42	22.81 ± 2.61	36.77 ± 5.58	36.86 ± 5.01	38.54 ± 4.71	38.59 ± 4.56	11.40 ± 2.94	11.36 ± 2.98
Obligately heterofermentative								
L. brevis	22.31 ± 3.77	22.77 ± 3.52	37.08 ± 4.96	37.23 ± 4.36	37 ± 6.24	36.77 ± 5.99	8.92 ± 5.30	8.69 ± 5.17

P−, experiment without proteinase K; and P+, experiment with proteinase K on the spots.

Please cite this article in press as: Samot J, Badet C, Antibacterial activity of probiotic candidates for oral health, Anaerobe (2012), http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.11.007

Table 3
Synthesis of the different characteristics of lactobacilli for probiotic interest.

Name of the strain	Inhibition diameter (mm)								H_2O_2 production	Glycerol dehydratase gene
	Sm		Av		Fn		Pg			
	P−	P+	P−	P+	P−	P+	P−	P+		
22A (*L. brevis*)	21	22	40	40	40	40	13	12	Yes	No
31A (*L. brevis*)	28	28	40	40	40	40	14	14	No	No
34A (*L. rhamnosus*)	26	26	40	40	40	40	17	17	No	No
57A1 (*L. brevis*)	30	31	40	40	40	40	12	11	No	No
BMS2 (*L. plantarum*)	28	26	40	40	40	40	16	15	No	No
CJS1 (*L. paracasei*)	29	28	40	40	40	40	11	11	No	No

Sm, *Streptococcus mutans*; Av, *Actinomyces viscosus*; Fn, *Fusobacterium nucleatum*; Pg, *Porphyromonas gingivalis*; P−, experiment without proteinase K; and P+, experiment with proteinase K on the spots.

a probiotic approach for the management of these oral infections. Before carrying out *in vivo* studies, numerous *in vitro* experiments are needed to define a probiotic candidate [34].

In a previous article, we have already reported the adherence properties of salivary lactobacilli [18], so this work aimed to study the antimicrobial activity of these selected strains against putative pathogenic oral species.

Like other studies that have shown the inhibitory effects of well known probiotic lactobacilli against some oral pathogens [10,35,36], our results allow us to highlight some autochtonous lactobacilli exhibiting the same properties.

Our lactobacilli inhibited all oral pathogens tested at varying degrees. The strongest inhibitory effects were seen in strains of *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* and *L. brevis* which are in agreement with the results of various studies [16,17,19,37,38].

However, these positive results disagree with those of Testa et al. who found no antagonistic interaction between oral lactobacilli and the anaerobes *Prevotella intermedia* and *F. nucleatum* [39]. Indeed, only 1.5% of our oral lactobacilli strains were unable to inhibit *F. nucleatum*, and 75.75% showed a strong antibacterial activity against this species.

This difference in results may be explained in part by the use of different methods and secondly by the difference in sample of strains tested by Testa et al. Thus, we agree with Van Essche who concluded that results of antagonism assays obtained by different techniques are incomparable [40].

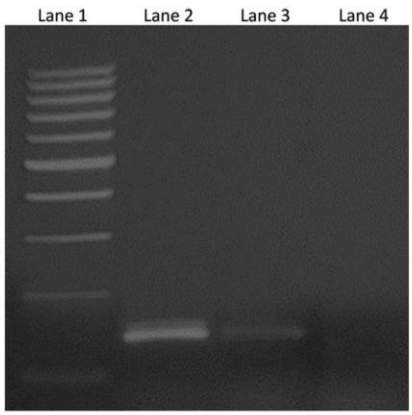


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of the Glycerol dehydratase gene of a salivary *L. gasseri*. Lane 1: molecular mass marker; Lane 2: 275-bp amplicon DNA sequence from salivary *L. gasseri*; Lane 3: 275-bp amplicon DNA sequence from template *L. collinoides IOEB 9527*; and Lane 4: negative control.

In an attempt to generate experimental data related to the antibacterial activity of our oral lactobacilli, we initiated some preliminary characterization of the mechanism involved in this property.

Even if no studies have definitively demonstrated its impact on the ability of a strain to compete within the oral cavity, bacteriocin production is an important criterion in the selection of a probiotic strain because it is believed to provide an advantage for survival in the ecological niche and to prevent the growth of pathogens. As a previous study has shown that our most adherent strains were *L. gasseri* [18], we wanted to investigate the presence of a bacteriocin already described in these strains, gassericin A. Especially since, Koll-Klais showed that *L. gasseri* were prevalent in healthy individuals [17]. So, in a first time we looked for the gassericin A gene, even if in our experiment, antibacterial activity was not lost after a proteinase K treatment. Indeed, it is well known that the production of bacteriocin is strongly dependant of culture conditions [41–43]. None of our tested strains exhibited this gene. This is not surprising because it has been shown that the genes encoding bacteriocins could be carried by plasmids and it has already been proven for gassericin A gene [44,45].

Other molecules are involved in the antibacterial action of lactobacilli. Various studies have characterized reuterin as a broad-spectrum antimicrobial compound, effective against both gram-positive and -negative strains, as well as several fungi and protozoa [46,47]. *L. reuteri* are not the only *Lactobacillus* species capable to produce reuterin, as a *L. coryniformis* cheese isolate [24] was also found to be a producer. As the research of reuterin goes through the identification of the glycerol dehydratase [25], in a second time we looked for the Glycerol Dehydratase (GD) gene. Among all our 66 strains, we found only one strain exhibiting this gene. Surprisingly, this strain did not belong to our six most effective bacteria. This may be due to the presence of a non functional gene.

To further elucidate the compounds responsible for the antimicrobial activity, our strains were also screened for production of hydrogen peroxide. Indeed, the inhibition of the growth of one bacterial species by the H_2O_2 generated by another species is a well-recognized mechanism of bacterial antagonism [20,21].

The present study corroborates other studies, which showed that some lactic acid bacteria can produce H_2O_2 [33].

However, among our most active strains concerning the antibacterial effect only one produced H_2O_2 (*L. brevis*), which confirms some studies claiming that the production of hydrogen peroxide is not the main mechanism of inhibition of lactobacilli [48].

This study demonstrated the ability of certain lactobacilli to inhibit oral pathogens; however it is important to keep in mind that lactobacilli may be involved in carious lesions. *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. fermentum* and *L. rhamnosus* are the most involved strains [49]. This is why the use of lactobacilli as probiotics should be done after verifying the absence of deleterious effects on the tooth.

Please cite this article in press as: Samot J, Badet C, Antibacterial activity of probiotic candidates for oral health, Anaerobe (2012), http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.11.007

5. Conclusion

Even if the nature of their antimicrobial activity remains unclear, our *in vitro* experimentation of antibacterial properties of autochthonous oral lactobacilli showed, in addition with previous results, that some of the tested strains could be considered as suitable probiotics.

However, before proposing a suitable product for the maintenance of oral health, other tests seem necessary. The evaluation of the inhibitory activity could be extended to other pathogens such as growing species difficult *Aggregatibacter actinomycetemcomitans, P. intermedia* which have a well known role in periodontal disease.

Research should be undertaken on their ability to stimulate the immune system in cell culture and/or animal models.

Finally, care must be taken regarding the use of probiotics especially in immunocompromised people that is why a step is essential to study their relative safety before attempting clinical trials.

References

[1] Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. Periodontol 2000;2006(42): 80–7.
[2] Marsh PD, Moter A, Devine DA. Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. Periodontol 2000;2010(55):16–35.
[3] van Houte J. Role of micro-organisms in caries etiology. J Dent Res 1994;73: 672–81.
[4] Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. Adv Dent Res 1994;8:263–71.
[5] Moore WE, Moore LV. The bacteria of periodontal diseases. Periodontol 2000; 1994(5):66–77.
[6] Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. J Clin Periodontol 2000;27:722–32.
[7] Bradshaw DJ, Marsh PD, Watson GK, Allison C. Role of *Fusobacterium nucleatum* and coaggregation in anaerobe survival in planktonic and biofilm oral microbial communities during aeration. Infect Immun 1998;66: 4729–32.
[8] Slots J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in periodontal disease: introduction. Periodontol 2000;1999(20):7–13.
[9] Sanders ME. Probiotics: definition, sources, selection, and uses. Clin Infect Dis 2008;46(Suppl. 2):S58–61. Discussion S144–51.
[10] Nase L, Hatakka K, Savilahti E, Saxelin M, Ponka A, Poussa T, et al. Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in milk on dental caries and caries risk in children. Caries Res 2001;35: 412–20.
[11] Ahola AJ, Yli-Knuuttila H, Suomalainen T, Poussa T, Ahlstrom A, Meurman JH, et al. Short-term consumption of probiotic-containing cheese and its effect on dental caries risk factors. Arch Oral Biol 2002;47:799–804.
[12] Meurman JH. Probiotics: do they have a role in oral medicine and dentistry? Eur J Oral Sci 2005;113:188–96.
[13] Kang MS, Oh JS, Lee HC, Lim HS, Lee SW, Yang KH, et al. Inhibitory effect of *Lactobacillus reuteri* on periodontopathic and cariogenic bacteria. J Microbiol 2011;49:193–9.
[14] Caglar E, Cildir SK, Ergeneli S, Sandalli N, Twetman S. Salivary mutans streptococci and lactobacilli levels after ingestion of the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 by straws or tablets. Acta Odontol Scand 2006;64:314–8.
[15] Strahinic I, Busarcevic M, Pavlica D, Milasin J, Golic N, Topisirovic L. Molecular and biochemical characterizations of human oral lactobacilli as putative probiotic candidates. Oral Microbiol Immunol 2007;22:111–7.
[16] Koll P, Mandar R, Marcotte H, Leibur E, Mikelsaar M, Hammarstrom L. Characterization of oral lactobacilli as potential probiotics for oral health. Oral Microbiol Immunol 2008;23:139–47.
[17] Koll-Klais P, Mandar R, Leibur E, Marcotte H, Hammarstrom L, Mikelsaar M. Oral lactobacilli in chronic periodontitis and periodontal health: species composition and antimicrobial activity. Oral Microbiol Immunol 2005;20: 354–61.
[18] Samot J, Lebreton J, Badet C. Adherence capacities of oral lactobacilli for potential probiotic purposes. Anaerobe 2011;17:69–72.
[19] Sookkhee S, Chulasiri M, Prachyabrued W. Lactic acid bacteria from healthy oral cavity of Thai volunteers: inhibition of oral pathogens. J Appl Microbiol 2001;90:172–9.
[20] Otero MC, Nader-Macias ME. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by H_2O_2-producing *Lactobacillus gasseri* isolated from the vaginal tract of cattle. Anim Reprod Sci 2006;96:35–46.
[21] Ito A, Sato Y, Kudo S, Sato S, Nakajima H, Toba T. The screening of hydrogen peroxide-producing lactic acid bacteria and their application to inactivating psychrotrophic food-borne pathogens. Curr Microbiol 2003;47:231–6.
[22] Dobson A, Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocin production: a probiotic trait? Appl Environ Microbiol 2012;78:1–6.
[23] Axelsson LT, Chung TC, Dobrogosz WJ, Lindgren SE. Production of a broad spectrum antimicrobial substance by Lactobacillus reuteri. Microb Ecology Health Dis 1989;2:131–6.
[24] Martin R, Olivares M, Marin ML, Xaus J, Fernandez L, Rodriguez JM. Characterization of a reuterin-producing *Lactobacillus coryniformis* strain isolated from a goat's milk cheese. Int J Food Microbiol 2005;104:267–77.
[25] Vollenweider S, Lacroix C. 3-hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production. Appl Microbiol Biotechnol 2004; 64:16–27.
[26] Román-Méndez C, Badet C, Yáñez A, Dominguez ML, Giono S, Richard B, et al. Identification of oral strains of *Lactobacillus* species isolated from Mexican and French children. J Dent Oral Hyg 2009;1:9–16.
[27] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J Bacteriol 1991;173:697–703.
[28] Fleming HP, Etchells JL, Costilow RN. Microbial inhibition by an isolate of pediococcus from cucumber brines. Appl Microbiol 1975;30:1040–2.
[29] Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JA. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. Nucleic Acids Res 2007;35: W71–4.
[30] Kawai Y, Saito T, Suzuki M, Itoh T. Sequence analysis by cloning of the structural gene of gassericin A, a hydrophobic bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* LA39. Biosci Biotechnol Biochem 1998;62:887–92.
[31] Kawai Y, Saito T, Kitazawa H, Itoh T. Gassericin A; an uncommon cyclic bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* LA39 linked at N- and C-terminal ends. Biosci Biotechnol Biochem 1998;62:2438–40.
[32] Claisse O, Lonvaud-Funel A. Primers and a specific DNA probe for detecting lactic acid bacteria producing 3-hydroxypropionaldehyde from glycerol in spoiled ciders. J Food Prot 2001;64:833–7.
[33] Eschenbach DA, Davick PR, Williams BL, Klebanoff SJ, Young-Smith K, Critchlow CM, et al. Prevalence of hydrogen peroxide-producing Lactobacillus species in normal women and women with bacterial vaginosis. J Clin Microbiol 1989;27:251–6.
[34] FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London Ontario, Canada: FAO/WHO; 2002.
[35] Iniesta M, Herrera D, Montero E, Zurbriggen M, Matos AR, Marin MJ, et al. Probiotic effects of orally administered *Lactobacillus reuteri*-containing tablets on the subgingival and salivary microbiota in patients with gingivitis. A randomized clinical trial. J Clin Periodontol 2012;39:736–44.
[36] Ishikawa H, Aiba Y, Nakanishi M, Oh-Hashi Y, Koga Y. Suppression of periodontal pathogenic bacteria in the saliva of humans by the administration of *Lactobacillus salivarius* TI2711. J Japan Assoc Periodontol 2003;45:105–12.
[37] Simark-Mattsson C, Emilson CG, Hakansson EG, Jacobsson C, Roos K, Holm S. Lactobacillus-mediated interference of mutans streptococci in caries-free vs. caries-active subjects. Eur J Oral Sci 2007;115:308–14.
[38] Teanpaisan R, Piwat S, Dahlen G. Inhibitory effect of oral Lactobacillus against oral pathogens. Lett Appl Microbiol 2011;53:452–9.
[39] Testa MM, Ruiz de Valladares R, Benito de Cardenas IL. Antagonistic interactions among *Fusobacterium nucleatum* and *Prevotella intermedia* with oral lactobacilli. Res Microbiol 2003;154:669–75.
[40] van Essche M, Loozen G, Godts C, Boon N, Pauwels M, Quirynen M, et al. Bacterial antagonism against periodontopathogens. J Periodontol 2012.
[41] Todorov SD, Dicks LM. Effect of medium components on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* strains ST23LD and ST341LD, isolated from spoiled olive brine. Microbiol Res 2006;161:102–8.
[42] Balasubramanyam BV, Varadaraj MC. Cultural conditions for the production of bacteriocin by a native isolate of *Lactobacillus delbruecki* ssp. *bulgaricus* CFR 2028 in milk medium. J Appl Microbiol 1998;84:97–102.
[43] Vignolo GM, de Kairuz MN, de Ruiz Holgado AAPa, Oliver G. Influence of growth conditions on the production of lactocin 705, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL 705. J Appl Microbiol 1995;78:5–10.
[44] Ito Y, Kawai Y, Arakawa K, Honme Y, Sasaki T, Saito T. Conjugative plasmid from *Lactobacillus gasseri* LA39 that carries genes for production of and immunity to the circular bacteriocin gassericin A. Appl Environ Microbiol 2009;75:6340–51.
[45] Van Reenen CA, Van Zyl WH, Dicks LM. Expression of the immunity protein of plantaricin 423, produced by Lactobacillus plantarum 423, and analysis of the plasmid encoding the bacteriocin. Appl Environ Microbiol 2006;72:7644–51.
[46] Talarico TL, Dobrogosz WJ. Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. Antimicrob Agents Chemother 1989;33:674–9.
[47] Cadieux P, Wind A, Sommer P, Schaefer L, Crowley K, Britton RA, et al. Evaluation of reuterin production in urogenital probiotic *Lactobacillus reuteri* RC-14. Appl Environ Microbiol 2008;74:4645–9.
[48] O'Hanlon DE, Moench TR, Cone RA. In vaginal fluid, bacteria associated with bacterial vaginosis can be suppressed with lactic acid but not hydrogen peroxide. BMC Infect Dis 2011;11:200.
[49] Svec P, Kukletova M, Sedlacek I. Comparative evaluation of automated ribotyping and RAPD-PCR for typing of *Lactobacillus* spp. occurring in dental caries. Antonie Van Leeuwenhoek 2010;98:85–92.

Please cite this article in press as: Samot J, Badet C, Antibacterial activity of probiotic candidates for oral health, Anaerobe (2012), http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.11.007