



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse (INSA Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Microbiologie et Biocatalyse Industrielles

Présentée et soutenue par :

Doan-Thanh-Lam LE

le : vendredi 14 octobre 2011

Titre :

Identification et caractérisation des déterminants physico-chimiques et biologiques
mis en jeu dans l'adhésion de *Lactococcus lactis* à la mucine modèle PGM

JURY

Nicholas LINDLEY, Directeur de Recherche CNRS, LISBP, Toulouse	Président
Sandor KASAS Directeur de Recherches EPFL Lausanne	Rapporteur
Christophe LACROIX, Professeur ETH Zurich	Rapporteur
Marie-Pierre CHAPOT-CHARTIER, Directeur de Recherche INRA, MICALIS, Jouy-en-Josas	Examinatrice
Pierre-Emmanuel MILHIET, Directeur de Recherche CNRS, CBS, Montpellier	Examineur
Muriel MERCIER-BONIN, Chargée de Recherche INRA, LISBP, Toulouse	Directrice de thèse
Etienne DAGUE, Chargé de Recherche CNRS, LAAS, Toulouse	Co-directeur de thèse

Ecole doctorale : Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de Recherche : Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, UMR 5504/792

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier dans un premier temps l'ensemble du Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP) – INSA Toulouse, ainsi que les membres de l'équipe « Génie du métabolisme des Procaryotes » - EAD4, pour leur accueil sympathique et leur coopération professionnelle tout au long de ma thèse. J'ai eu également le plaisir de travailler au sein du Groupe « Nanobiosystèmes » - NBS, du Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (LAAS) – CNRS et j'adresse ma profonde reconnaissance à tous les membres du Groupe, en particulier les personnes du LAAS hébergées à l'Institut de Technologies Avancées en sciences du Vivant (ITAV).

- Je remercie particulièrement Monsieur **Nicholas LINDLEY**, Directeur du laboratoire LISBP, et Monsieur **Pascal LOUBIERE**, Responsable de l'équipe EAD4. Je remercie également Monsieur **Liviu NICU**, Responsable du groupe NBS. Ils m'ont réservé le meilleur accueil au sein de très bonnes équipes de recherche.
- Je remercie sincèrement Madame **Muriel MERCIER-BONIN**, ma directrice de thèse pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de diriger cette thèse ; pour son accueil, la confiance et la gentillesse qu'elle m'a accordées dès mon arrivée au laboratoire ; pour m'avoir intégré rapidement au sein d'un groupe dynamique... sans oublier sa participation dévouée au cheminement de ce manuscrit.
- Je remercie profondément Monsieur **Etienne DAGUE**, mon co-directeur de thèse pour les conseils et les encouragements qu'il a su me prodiguer au cours de ma thèse avec beaucoup de confiance et de pédagogie. Tout au long de ces trois années, il s'est fortement investi dans l'orientation de mes travaux de recherche, en me faisant découvrir de nouveaux concepts au travers de son regard scientifique et de son expérience précieuse dans le domaine.
- Je remercie en même temps Mademoiselle **Marie-Pierre DUVIAU**, ma collègue du LISBP, pour son investissement dans la réalisation des mesures expérimentales.

Les groupes EAD4 du LISBP et NBS du LAAS m'ont permis de réaliser des expérimentations robustes et fiables dans de très bonnes conditions scientifiques, matérielles et humaines. Un grand merci à mes collègues, **Myriam MERCADE**, **Sébastien NOUAILLE**, **Valérie LAROUTE**, **Sophie MONDEIL**, **Emmanuelle TREVISIOL**, **Flora PICARD**, **Marie-Anne GAURIAT**, **Jérôme LEHIR**, **Ly TRAN** du LISBP,

ainsi que **Childéric SEVERAC**, **Franck CARCENAC**, **Christel MARTIN- CERCLIER**, **Eric JAUVERT** du LAAS... pour leurs conseils et leur aide indispensable lors de la réalisation de ma thèse et la préparation de ma soutenance.

- J'ai eu également le plaisir de collaborer avec le Laboratoire « Institute of Biochemistry and Biophysics » - IBB, Pologne ainsi que l'Unité MICALIS, Jouy-en-Josas. Je pense tout particulièrement à Monsieur **Jacek BARDOWSKI** de l'IBB, Madame **Marie-Pierre CHAPOT-CHARTIER** et Monsieur **Jean-Christophe PIARD** de MICALIS. Je leur adresse mes plus vifs remerciements pour m'avoir fourni des souches de *L. lactis* intéressantes, qui constituent un élément-clé de ce travail de thèse.

Je tiens à remercier également les personnes suivantes, pour leurs conseils précieux et les expériences enrichissantes que j'ai pu vivre grâce à elles :

- Je présente toute ma reconnaissance à Monsieur **Philippe MARCUS** et Mesdames **Sandrine ZANNA** et **Isabelle FRATEUR** pour m'avoir permis de réaliser des expérimentations au Laboratoire de Physico-Chimie des Surfaces, Paris, et m'avoir beaucoup aidé dans l'interprétation des résultats obtenus.
- Je remercie Messieurs **Philippe SCHMITZ**, **Luc FILLAUDEAU** des équipes EAD7 et EAD8 du LISBP, pour leur aide dans la réalisation des expériences et dans l'analyse et l'interprétation des résultats obtenus.
- J'adresse mes vifs remerciements à Messieurs **Christophe LACROIX** et **Sandor KASAS**, les rapporteurs de la thèse, pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail; sachant alimenter et faire progresser mon questionnement scientifique.
- Je remercie également Monsieur **Pierre-Emmanuel MILHIET** pour avoir accepté d'être examinateur et de participer au Jury de défense de cette thèse.
- Je suis très reconnaissant envers Madame **Marion GRARE** pour le temps qu'elle a consacré à relire attentivement et à corriger ce manuscrit.

Je souhaiterais remercier l'Institut National de la Recherche Agronomique, INRA France, ainsi que les Départements CEPIA et MICA pour m'avoir fait confiance et m'avoir permis de réaliser ce travail de thèse.

Je tiens enfin à remercier profondément les personnes qui font partie de ma vie : ma famille et mes amis, ceux qui ne sont pas là aujourd'hui pour partager ce moment avec moi. Recevez ce mémoire en guise de remerciement et témoignage de mon amour.

- Tôi xin cảm ơn **Bố LÊ Văn Sáng** : Ngay khi ngài chủ tịch hội đồng bảo vệ đọc quyết định trao chức danh Tiến sĩ và thông báo kết quả bảo vệ được sự khen ngợi cao nhất do toàn bộ hội đồng thống nhất thì tôi thực sự là vui sướng vì cái ngày quan trọng này tôi đã chờ đợi nó hơn bốn năm qua kể từ khi tôi bước chân đến nước Pháp. Ở thời điểm vô cùng đặc biệt này tôi nhớ đến ngay người cha của mình. Thật là tiếc rằng cha tôi không thể đợi để thấy tôi trở thành tiến sĩ và nhìn tấm bằng của tôi. Tôi muốn dành tặng món quà này cho cha mình. Tôi tin ở thế giới bên kia bố sẽ luôn tự hào về tôi. Dù không còn được gặp và nhìn bố nữa nhưng hình ảnh về Bố- người cha, người thầy, một tấm gương về tinh thần học tập và nghiên cứu sẽ luôn mãi mãi trong trái tim tôi.
- Tôi xin cảm ơn **Mẹ NGUYỄN THU HUƠNG** : Người đã chịu những năm tháng để đau đẻ sinh thành ra tôi cũng như em gái tôi. Bên cạnh với thiên chức người phụ nữ Việt Nam- Công Dung- Ngôn Hạnh, mẹ đã cả đời hi sinh vất vả, chịu khổ, làm lụng quần quật suốt ngày để nuôi nấng chúng tôi đến ngày hôm nay. Công ơn của mẹ là trời bể, không có gì có thể bù đắp hết được những năm tháng đã qua. Trong thời điểm này thì Tấm bằng tiến sĩ của tôi chính là món quà đầu tiên thật ý nghĩa để dành cho mẹ. Sau khi trở về Việt Nam con sẽ dành nhiều thời gian hơn để chăm nom và phụng dưỡng mẹ.
- Tôi luôn luôn nhớ đến những công ơn, giúp đỡ và động viên của **Bà ngoại Đoàn Thị Tâm** cùng **Chú LÊ Văn Bính**. Khi cha tôi mất đi, chính bà ngoại và chú là hai người đã hết sức động viên, giúp đỡ tôi cả về vật chất và tinh thần để tôi có thể cố gắng, vươn lên trong học tập và cuộc sống. Những thành công của tôi không thể có nếu thiếu đi họ, hai người thân ruột thịt như cha mẹ tôi.
- Và những người bạn luôn bên tôi : Bên cạnh gia đình, sự nỗ lực của bản thân thì thành quả của ngày hôm nay cũng có sự đóng góp rất nhiều của **các bạn sinh viên tại Pháp và Toulouse**. Những lời động viên, tình cảm nồng hậu và sự giúp đỡ của các anh chị em đã cho tôi có thêm nghị lực để vượt qua mọi khó khăn và đi đến thành quả của ngày hôm nay. Dù ở bất cứ phương trời nào ở thì trong trái tim tôi sẽ luôn có các bạn.

RESUME

Dans le tractus gastro-intestinal, l'adhésion des bactéries commensales à l'épithélium permet leur maintien, ce qui aide à contrôler l'implantation de germes indésirables par des mécanismes de concurrence (effets nutritionnels, sites spécifiques d'adhésion ...). Bien que le rôle de la couche du mucus (principalement composée de glycoprotéines à haut poids moléculaire, appelées mucines) recouvrant la muqueuse soit connu et décrit depuis de nombreuses années, notamment pour sa fonction de barrière protectrice, l'intérêt pour décrypter les mécanismes précis d'interaction(s) avec le microbiote (bactéries commensales, pathogènes ou probiotiques) n'a que récemment émergé. Dans ce cadre, l'objectif de cette thèse, menée en collaboration entre le Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés de Toulouse et le Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes de Toulouse, est de caractériser *in vitro* le comportement muco-adhésif de *Lactococcus lactis*, le modèle des bactéries lactiques, en utilisant des approches de quantification multi-échelles (du niveau moléculaire à l'échelle multicellulaire) sur un large panel de souches naturelles et recombinantes. Une attention particulière est accordée au rôle des mucines, en utilisant le modèle PGM (mucine gastrique de porc ou « Pig Gastric Mucin »).

La première partie du travail a porté sur la quantification à l'échelle de la cellule unique des interactions entre *L. lactis* et une surface abiotique (polystyrène) recouverte de PGM, en utilisant la microscopie à force atomique (AFM). La faisabilité de la méthode a tout d'abord été démontrée sur la souche modèle *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1820. La couche de PGM a été caractérisée en utilisant des méthodes analytiques complémentaires (AFM, XPS - spectroscopie de photoélectrons induits par rayons X, QCM-D - Microbalance à Quartz à mesure de Dissipation...). En parallèle, les bactéries *L. lactis* ont été immobilisées sur la pointe AFM et utilisées comme « sonde de force », en considérant la souche naturelle IBB477 (*L. lactis* ssp. *cremoris*), d'origine laitière et présentant une forte persistance dans le tractus digestif du rat lors d'essais réalisés *in vivo* (collaboration avec l'Institut de Biochimie et de Biophysique de Varsovie, Pologne). Comparé aux conditions contrôle (*i.e.*, surface de polystyrène sans PGM), les niveaux de force d'adhésion enregistrés entre *L. lactis* et PGM sont inférieurs, ceci en raison des répulsions électrostatiques, hydrophiles et stériques s'établissant entre la couche de PGM et la paroi cellulaire. La forme des courbes représentant l'évolution de la force au retrait en fonction de la distance est également différente. Une analyse détaillée souligne la contribution, conjointe et différente selon les souches testées, d'événements (i) non adhésifs, (ii) adhésifs non spécifiques (interactions électrostatiques,

hydrophobes, de van der Waals) et (iii) adhésifs spécifiques (liaison de type ligand/récepteur). La contribution spécifique a ensuite été explorée plus finement en termes de constantes cinétiques d'association et de dissociation.

Nous avons, par ailleurs, poursuivi notre exploitation de la biodiversité naturelle chez les lactocoques en étudiant la souche TIL448 (*L. lactis* ssp. *lactis*) d'origine végétale, en collaboration avec l'Institut MICALIS de Jouy-en-Josas. Nous avons ainsi démontré, pour la première fois chez *L. lactis*, le rôle combiné des protéines à domaine(s) MUB (« Mucus-Binding ») et des pili, à travers l'analyse approfondie des données AFM (force d'adhésion, répartition des événements adhésifs spécifiques/non spécifiques, distances d'interaction...). Le rôle des pili a été confirmé sur des souches recombinantes piliées (*L. lactis* ssp. *lactis* IL1403), toujours en partenariat avec l'Institut MICALIS de Jouy-en-Josas. En parallèle, en collaboration avec l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle de Villeneuve d'Ascq, nous avons cherché à identifier les O-glycannes de PGM (fractions neutre et acide), impliqués dans le processus d'interaction avec la surface bactérienne.

Pour confirmer l'ensemble des résultats obtenus à l'échelle de la cellule unique et en mode statique par AFM (effet anti-adhésif de PGM, comportement muco-adhésif différent selon les souches de *L. lactis*), la deuxième partie du travail a été consacrée à des expérimentations à l'échelle de l'ensemble de la population bactérienne, en conditions dynamiques (QCM-D, chambre à écoulement cisailé). Nous avons évalué par QCM-D chez les souches IBB477 et MG1820 les propriétés viscoélastiques des dépôts bactériens, en relation avec le comportement bio-adhésif vis-à-vis de la couche de PGM. Les données obtenues par AFM et chambre à écoulement cisailé sur ces mêmes souches ont été confrontées pour accéder plus finement au mode d'interaction avec PGM (densité de liaisons sur la surface bactérienne). Enfin, nous avons évalué chez IL1403 l'effet des pili sur la dynamique de détachement et d'orientation sous cisaillement contrôlé.

En conclusion, la combinaison des échelles d'observation et d'analyse, aussi bien au niveau de la cellule unique qu'à celui de l'ensemble de la population bactérienne, nous permet désormais de disposer de nouvelles connaissances sur les mécanismes diversifiés d'interaction entre *L. lactis* et PGM, visant à une meilleure compréhension des fonctionnalités de cette bactérie au niveau du tractus gastro-intestinal.

Mots-clés : *L. lactis*, mucine modèle PGM, muco-adhésion bactérienne, cellule unique, population bactérienne, hydrodynamique, viscoélasticité, protéine à domaines MUB, pili, O-glycannes.

ABSTRACT

In the gastrointestinal tract, adhesion of commensal bacteria to epithelial cells allows their retention, which helps to control the implementation of unwanted germs through mechanisms of competition (nutritional effects, specific sites of adhesion ...). Indeed, bacterial adhesion to the intestinal epithelium seems to be important for the balance of intestinal microbiota. Although the role of the mucus layer lining the mucosa, which is mainly composed of large glycoproteins termed mucins, is known and described for many years, particularly for its protective barrier function, the interest for unraveling precise mechanisms of interaction with bacteria (commensal, pathogens or probiotics) has just recently emerged. In this framework, the aim of the PhD thesis was to characterize *in vitro* muco-adhesive behavior of *Lactococcus lactis*, the model of Lactic Acid Bacteria, using multi-scale approaches (from molecular to multicellular levels) on a large set of natural and recombinant strains. A particular attention was paid to the role of mucins, using the PGM model (Pig Gastric Mucin).

The first part of the work was focused on the quantification at nanoscale of interactions between *L. lactis* and adsorbed PGM, using AFM. The feasibility of the method was first demonstrated on the reference strain MG1820. PGM coating was characterized using a complementary set of analytical methods (AFM, XPS, quartz crystal microbalance with dissipation monitoring...). In parallel, *L. lactis* cells were immobilized onto the AFM tip and used as a living force probe, considering the natural strain IBB477 (*L. lactis* subsp. *cremoris*), isolated from Polish artisanal dairy products and previously shown to display *in vivo* retention in the rat gut (collaboration with the Institute of Biochemistry and Biophysics of Warsaw, Poland). Compared to control conditions (*i.e.*, no PGM coating), adhesion force levels recorded for PGM were lower, due to the interplay of electrostatic, hydrophilic and steric repulsions. The shape of retraction force-distance curves for *L. lactis*/PGM interactions was also different. The detailed analysis of curve shape highlighted the contribution of non-adhesive, non-specific (electrostatic, hydrophobic, van der Waals interactions) and specific adhesive events (ligand/receptor bonding), depending on the strain under study. Specific forces were analyzed in terms of dissociation/association kinetic constants.

We then explored the natural biodiversity among lactococci by studying the natural strain of *L. lactis* (subsp. *lactis*) TIL448 from plant origin, in collaboration with MICALIS (Jouy-en-Josas). We demonstrated, for the first time for *L. lactis*, the combined role played by “MUB-like” domain-containing protein and pili, through the thorough analysis of AFM data

(adhesion force, repartition of specific/non-specific adhesive events and distances of interaction...). The role of pili was also confirmed with recombinant piliated strains (*L. lactis* subsp. *lactis* IL1403), in partnership with MICALIS (Jouy-en-Josas). In parallel, in collaboration with the “Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle de Villeneuve d'Ascq”, a first attempt was done to identify the O-glycans of PGM (neutral and acid fractions), involved in interactions with the bacterial surface.

To confirm these results achieved at single-cell scale and under static mode by AFM (anti-adhesive of PGM, different muco-adhesive properties among several strains of *L. lactis*), the second part of the work was devoted to experiments at multicellular scale under dynamic conditions (quartz crystal microbalance with dissipation monitoring – QCM-D, shear stress flow chamber). We evaluated by QCM-D, for MG1820 and IBB477 strains, the viscoelastic properties of the cell layers, in relation with the bio-adhesive behavior towards PGM. The data obtained by AFM and shear stress flow chamber were combined to access more precisely to the interaction mode with PGM (density of bonds over the cell surface). Finally, using the recombinant piliated strain (IL1403), we focused on the effect of pili on detachment and re-orientation dynamics under shear flow.

As a conclusion, the combination of complementary scales of observation and analysis, including single-cell and multicellular targeted experiments, let us now to get new insights into the interplay of interaction mechanisms between *L. lactis* and mucins, aiming at a better understanding of the behavior of this bacteria within the gastrointestinal tract.

Key-words: *L. lactis*, model mucin PGM, bacterial muco-adhesion, single cell, bacterial population, hydrodynamics, viscoelasticity, MUB domain-containing protein, pili, O-glycans

VALORISATION DES TRAVAUX

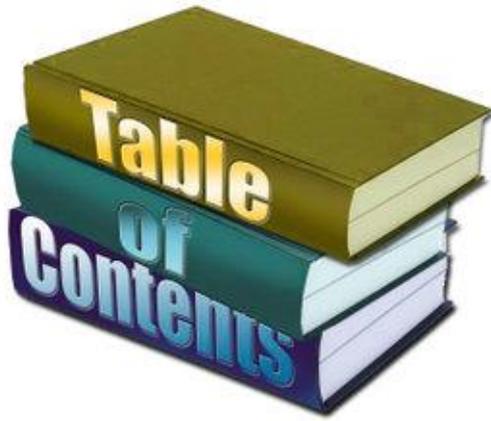
Articles dans des revues à comité de lecture

- **Le D.T.L.***, Dague E. *, Zanna S., Marcus P., Loubière P. and Mercier-Bonin M., 2010, Probing *in vitro* interactions between *Lactococcus lactis* and mucins using AFM, *Langmuir*, 26, 11010–11017
* co-premiers auteurs
- **Le D.T.L.**, Guérardel Y., Loubière P., Mercier-Bonin M. and Dague E., 2011, Measuring kinetic dissociation/association constants between *Lactococcus lactis* bacteria and mucins, using living cell probes, *Biophysical Journal*, 101, 2843-2853
- **Le D.T.L.**, Loubière P., Dague E. and Mercier-Bonin M., Muco-adhesive properties of *Lactococcus lactis* investigated by Quartz crystal microbalance with dissipation monitoring, soumise à *Langmuir* en septembre 2011

Communications

- **Le D.T.L.**, Kowalczyk M., Duviau M.P., Bardowski J., Loubière P., Dague E. et Mercier-Bonin M., 2010, Mucosal adhesion of lactic acid bacteria: investigation of mucins/*Lactococcus lactis* interactions using AFM, 17^{ème} Colloque du Club des Bactéries Lactiques, 27-29 Octobre, Nancy, France (résumé, communication orale).
- **Le D.T.L.**, Duviau M.P., Loubière P., Mercier-Bonin M. et Dague E., 2010, Mucosal adhesion of lactic acid bacteria: first investigation of mucins/*Lactococcus lactis* interactions at nanoscale, Seeing at the Nanoscale VIII, 30 août-1er septembre, Bâle, Suisse (résumé, poster).
- **Le D.T.L.**, Duviau M.P., Loubière P., Dague E. et Mercier-Bonin M., 2010, Mucosal adhesion of lactic acid bacteria: first investigation of mucins/*Lactococcus lactis* interactions at nanoscale, 3^{èmes} Journées Jeunes Chercheurs, 27-28 mai, Bordeaux, France (résumé, communication orale).
- **Le D.T.L.**, Dague E., Duviau M.P., Loubière P. et Mercier-Bonin M., 2010, Probing *in vitro* interactions between lactic acid bacteria and mucins using AFM: a case study on *Lactococcus lactis*, Journées des Microbiologistes de l'INRA, 5-7 mai, Poitiers, France (résumé, poster).
- **Le D.T.L.**, Duviau M.P., Loubière P., Dague E. et Mercier-Bonin M., 2009, Exploration par AFM des interactions entre *Lactococcus lactis* et les mucines de la muqueuse intestinale, Ecole Thématique CNRS Microbiologie et physico-chimie des biofilms, 19-23 octobre, Vittel, France (résumé, poster).
- **Le D.T.L.**, Duviau M.P., Loubière P., Dague E. et Mercier-Bonin M., 2009, Probing interactions between *Lactococcus lactis* and mucins using AFM, Eurobiofilms, 2-5 Septembre, Rome, Italie (résumé, communication orale).
- **Le D.T.L.**, Duviau M.P., Loubière P., Dague E. et Mercier-Bonin M., 2009, Exploration par AFM des interactions entre *Lactococcus lactis* et les mucines de la muqueuse intestinale, 16^{ème} Colloque du Club des Bactéries Lactiques, 27-29 Mai, Toulouse, France (résumé, poster).

Table des matières



Partie I – Synthèse bibliographique	7
1. Bactéries lactiques	9
1.1. Généralités.....	9
1.2. Probiotiques.....	10
1.3. <i>Lactococcus lactis</i>	14
1.3.1. <i>L. lactis pour la délivrance d'antigènes et de protéines d'intérêt médical</i>	15
1.3.2. <i>L. lactis comme souche probiotique</i>	16
2. Composition, structure et fonctions de la couche de mucus : rôle des mucines.....	18
2.1. Couche de mucus.....	18
2.2. Structure et propriété des mucines.....	22
2.2.1. <i>Structure des mucines</i>	22
2.2.2. <i>Propriétés physiques des mucines en solution</i>	23
2.2.3. <i>Propriétés adhésives des mucines</i>	25
2.3. Propriété de barrière de la muqueuse en relation avec les pathologies	27
2.4. Rôle des mucines dans la fonction barrière	28
3. Mécanismes d'adhésion des BL à la muqueuse intestinale.....	32
3.1. Mécanismes physico-chimiques généraux, mis en jeu dans l'adhésion bactérienne à une surface solide : application aux BL	32
3.2. Composition de la paroi des lactocoques	33
3.3. Rôle des déterminants de surface des BL dans l'adhésion à la muqueuse intestinale.....	36
3.3.1. <i>Protéines de surface</i>	36
3.3.1. <i>Autres déterminants de surface</i>	40
3.3.2. <i>Mécanismes d'adhésion et déterminants de surface chez L. lactis</i>	41
3.4. Modèles d'adhésion à la muqueuse intestinale.....	43
4. Outils et méthodes <i>in vitro</i> pour quantifier l'adhésion bactérienne : vers le couplage d'échelles	45
4.1. Microscopie à force atomique (AFM).....	46
4.1.1. <i>Principe : imagerie et spectroscopie de force</i>	47
4.1.2. <i>Applications</i>	49
4.2. Chambre à écoulement cisailé.....	52
4.2.1. <i>Considérations théoriques</i>	52
4.2.2. <i>Application à l'adhésion bactérienne</i>	55
4.3. Microbalance à quartz à mesure de dissipation (QCM-D)	57
4.3.1. <i>Principe</i>	57
4.3.2. <i>Applications à l'adhésion bactérienne</i>	59

Partie II – Objectifs et Programme de travail	63
1. Questions scientifiques et objectifs du travail.....	65
2. Stratégie mise en œuvre et articulation des différents chapitres de résultats	66
Partie III – Résultats de la thèse.....	73
1. A l'échelle de la cellule unique	75
1.1. Caractérisation physico-chimique des souches IBB477 et MG1820	75
1.2. Quantification directe des interactions <i>L. lactis</i> / PGM par AFM.....	78
Probing <i>in vitro</i> interactions between <i>Lactococcus lactis</i> and mucins using AFM	78
1.3. Détermination des constantes cinétiques associées aux interactions spécifiques entre <i>L. lactis</i> et la mucine PGM	87
Measuring kinetic dissociation/association constants between <i>Lactococcus lactis</i> bacteria and mucins using living cell probes.....	87
1.4. Identification et caractérisation des protéines de surface impliquées dans l'interaction entre <i>L. lactis</i> et la mucine PGM.....	100
Deciphering the role of surface proteins in the muco-adhesive properties of <i>Lactococcus lactis</i> with AFM force spectroscopy.....	101
2. A l'échelle de l'ensemble de la population bactérienne.....	122
2.1. Quantification des propriétés muco-adhésives de <i>L. lactis</i> par Microbalance à quartz à mesure de dissipation (QCM-D)	122
Real-time investigation of <i>Lactococcus lactis</i> muco-adhesive properties using quartz crystal microbalance with dissipation monitoring.....	123
2.2. Détachement de <i>L. lactis</i> sous cisaillement contrôlé : modélisation de la force d'adhésion à la mucine PGM.....	151
Detachment of <i>Lactococcus lactis</i> from PGM-coated surfaces under controlled shear flow: modelling of the adhesion force.....	152
2.3. Evaluation du rôle des pili dans la muco-adhésion chez <i>L. lactis</i>	181
Unraveling at multi-scale the role of pili in <i>Lactococcus lactis</i> muco-adhesion	182
Partie IV - Synthèse des résultats, Discussion générale et Perspectives	207
1. Synthèse des résultats et discussion générale	209
2. Perspectives du travail	219
Références bibliographiques.....	221

Abréviations

AFM : Microscopie à force atomique

BL : Bactéries lactiques

F_{ad} : Force d'adhésion

K_{off} , K_{on} : Constantes cinétiques de dissociation et d'association

LTA : Acide lipotéichoïque

MATS : Adhésion bactérienne aux solvants (Microbial Adhesion to Solvents)

MEB : Microscopie électronique à balayage

MUB : « Mucus-binding »

MUC : Mucine

PS : Polystyrène

PGM : Mucine gastrique de porc « Pig gastric mucin »

PS+PGM : Surface de polystyrène fonctionnalisée par PGM

QCM-D : Microbalance à quartz à mesure de dissipation

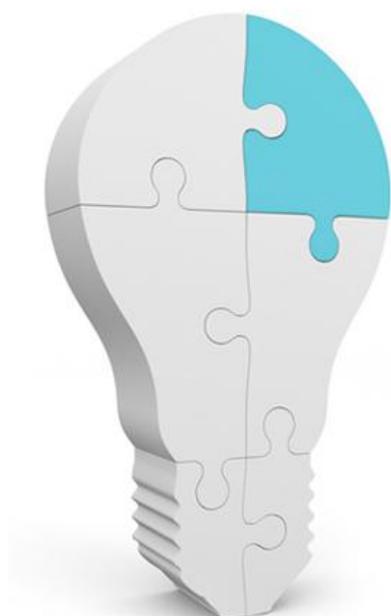
TA : Acide téichoïque

XPS : Spectroscopie de photo-électrons induits par rayon X

Δf , ΔD : Changements de la fréquence de résonance et de la dissipation, mesurés par QCM-D

$\tau_{w50\%}$: Contrainte de cisaillement nécessaire pour détacher 50% des bactéries initialement adhérentes lors des expériences de détachement réalisées en chambre à écoulement cisailé.

Introduction générale



Les probiotiques sont définis comme des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités suffisantes, peuvent exercer de nombreux bénéfices au niveau de la santé de l'hôte. L'intérêt et le champ des recherches dans ce domaine ont considérablement progressé ces dernières années. Les effets bénéfiques des probiotiques ont notamment été démontrés dans la prévention de la mortalité et de l'entérocolite nécrosante chez les nouveaux-nés de très faible poids. Des études récentes ont permis de mieux comprendre le rôle des probiotiques comme adjuvants de vaccins ainsi que dans la modulation de nombreuses pathologies comme les maladies inflammatoires de l'intestin, le cancer du côlon, le diabète de type 1, l'obésité, l'hypercholestérolémie... Le marché mondial des probiotiques est estimé à 32,1 milliards de dollars (soit 22 milliards d'euros) pour 2014 avec une croissance de 11,7 % entre 2009 et 2014. Avec un marché estimé en 2014 à 13,5 milliards de dollars (42 %), L'Europe est le premier consommateur, suivie par l'Asie (30 %).

Les bactéries lactiques (BL) représentent un groupe diversifié de bactéries dont le produit majeur de fermentation est l'acide lactique. Ces dernières années, l'activité probiotique de certaines BL (lactobacilles essentiellement) a été soulignée. Des études approfondies sur les effets bénéfiques pour la santé humaine ont ainsi été rapportées. En revanche, il n'existe que peu d'études sur l'activité probiotique de la BL modèle *Lactococcus lactis*, du fait de sa faible résistance supposée aux stress rencontrés dans le tractus gastro-intestinal (bas pH, présence de sels biliaries). Toutefois, plusieurs travaux ont montré la possibilité de persistance de *L. lactis* chez l'Homme ou chez l'animal. De nombreuses souches de lactocoques étant traditionnellement utilisées comme « starter » dans la fabrication des fromages et d'autres produits laitiers fermentés, l'établissement de propriétés probiotiques chez *L. lactis* pourrait conduire au développement de nouveaux aliments fonctionnels à visée « bio-thérapeutique ». Le séquençage récent du génome entier d'une souche probiotique de lactocoque (*L. lactis* CV56) offre désormais des informations précieuses sur la diversité génomique et métabolique, ainsi que sur les propriétés probiotiques et adaptatives de *L. lactis* dans différents environnements.

Parallèlement à l'identification de nouveaux probiotiques, nous avons observé l'émergence, au cours des deux dernières décennies, d'applications de *L. lactis* pour (i) la production de protéines hétérologues et (ii) la délivrance de gènes, de vaccins ou de médicaments. Le secteur des vaccins devient le premier marché mondial en termes de croissance pour l'industrie pharmaceutique avec une hausse de 21,5 % en 2008 pour un chiffre d'affaires de 19,5 milliards de dollars et ce marché devrait doubler pour atteindre plus

de 40 milliards de dollars en 2013. Parmi les vaccins, ceux de type mucosal présentent divers avantages, tels que la facilité d'administration et les coûts relativement faibles. Par ailleurs, la vaccination mucosale permet de provoquer des réponses à la fois de la muqueuse et du système immunitaire.

Au travers des différentes utilisations possibles des BL (souches probiotiques, stratégies d'administration de vaccins ou de délivrance de médicaments...), il apparaît que la capacité de muco-adhésion peut jouer un rôle majeur au niveau de l'interaction avec l'hôte. Les propriétés d'adhésion sont liées aux caractéristiques de surface des bactéries, qui sont à leur tour influencées par la composition, la structure et l'organisation de la paroi cellulaire. Les différentes études présentées dans la littérature sur l'adhésion des BL à la muqueuse intestinale sont généralement menées chez les lactobacilles. Elles démontrent que des protéines de la couche S, des protéines à domaines MUB (« Mucus-Binding ») et d'autres protéines à fonction particulière sont impliquées dans le processus bio-adhésif. D'autres composés non protéiques jouent également un rôle non négligeable comme les acides téichoïques (TA) et lipotéichoïques (LTA) ou certains exopolysaccharides.

Chez *L. lactis*, les travaux de la littérature sur l'adhésion aux surfaces biotiques, en relation avec la composition de la paroi bactérienne, sont rares, hormis quelques exemples où un pouvoir d'adhésion élevé à la muqueuse intestinale par rapport à d'autres BL comme *Lactobacillus rhamnosus*, *L. casei* ou *L. acidophilus* a été décrit. Les études plus nombreuses, réalisées jusqu'à présent sur les surfaces abiotiques (verre, polymères), permettent toutefois d'identifier, du moins pour partie, certains déterminants moléculaires impliqués dans les processus d'interaction (protéines de surface comme PrtP, acides téichoïques...).

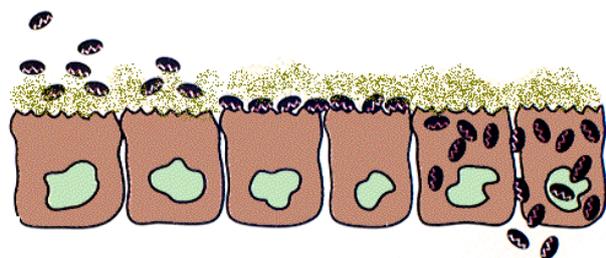
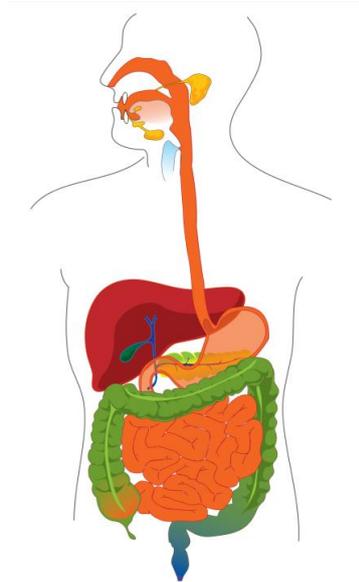
Afin d'étudier les processus multifactoriels de l'adhésion à la muqueuse intestinale, une grande variété de modèles *in vitro* a été développée comme, par exemple, les cellules dérivées Caco-2 ou HT29 chez l'Homme. Les cellules Caco-2 présentent de nombreuses propriétés similaires aux cellules de l'intestin grêle *in vivo* ; elles forment une monocouche polarisée de cellules différenciées présentant une bordure en brosse. Les cellules HT29 sont, elles, des cellules épithéliales intestinales humaines indifférenciées. Même si ces deux modèles de cellules sont aujourd'hui couramment utilisés, notamment pour la sélection de souches probiotiques, aucun n'intègre la présence du gel de mucus qui joue *in vivo* le rôle de barrière protectrice contre les agressions physiques et chimiques. L'un de ses composants majeurs est une famille de glycoprotéines à haut poids moléculaire, les mucines. Responsables des

propriétés viscoélastiques du mucus, ces dernières s'organisent selon un squelette protéique, lié à un réseau complexe de chaînes latérales oligosaccharidiques, cibles potentielles d'interaction avec les adhésines bactériennes et/ou source d'énergie pour le microbiote. Il a été démontré dans la littérature que certaines bactéries probiotiques pourraient stimuler la production de mucines par les cellules épithéliales intestinales sous condition d'adhésion. L'augmentation de la sécrétion de mucines extracellulaires serait, par ailleurs, l'un des facteurs mis en jeu par les probiotiques pour inhiber l'adhésion des bactéries pathogènes.

Dans ce cadre, la quantification des interactions physico-chimiques et biologiques des bactéries avec la couche du mucus, *via* l'un de ses constituants-clés les mucines, est sans nul doute un élément essentiel pour une meilleure maîtrise des fonctionnalités du tractus gastro-intestinal, même si jusqu'alors cette composante a peu été prise en compte. Face à ce constat, notre travail, mené en collaboration entre le Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés de Toulouse et le Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes de Toulouse, s'est focalisé sur les mécanismes de la muco-adhésion chez *L. lactis*. Dans ce contexte, les interactions ont été sondées aux échelles pertinentes (de la cellule unique à l'ensemble de la population bactérienne, aussi bien en conditions statiques que dynamiques). Nous avons ainsi mis en œuvre la Microscopie à force atomique (AFM), la Microbalance à quartz à mesure de dissipation (QCM-D) et la Chambre à écoulement cisailé. L'avantage de l'AFM repose sur la possibilité de manipuler en milieu aqueux une grande variété d'échantillons biologiques - des molécules uniques, comme les acides nucléiques ou les protéines, aux assemblages macromoléculaires ou aux cellules entières. De plus, l'AFM peut être utilisée en mode spectroscopie de force, qui offre un large éventail de stratégies pour étudier les mécanismes à l'échelle de la cellule/molécule unique. La QCM-D permet, quant à elle, de suivre *in situ* et en temps réel l'adsorption de macromolécules et, de manière plus récente, l'adhésion bactérienne, en évaluant les caractéristiques mécaniques des couches déposées (viscoélasticité, épaisseur). Enfin, la chambre à écoulement est généralement utilisée pour étudier l'adhésion et le détachement des microorganismes aux surfaces dans des conditions hydrodynamiques parfaitement contrôlées (écoulement laminaire). Les processus d'interaction sont appréhendés à l'échelle multicellulaire, permettant ainsi de prendre en compte d'éventuelles hétérogénéités au sein de la population microbienne (état physiologique, propriétés de surface...). Il faut noter que ces techniques, utilisées dans la présente étude seules ou en combinaison, n'ont jamais été décrites dans la littérature pour quantifier la muco-adhésion. Nous avons, par ailleurs, mis à profit la biodiversité naturelle observée chez

L. lactis, en testant des souches d'origine (laitière vs. végétale) et de sous-espèce (*lactis* vs. *cremoris*) différentes. Nous avons choisi pour notre étude la mucine modèle PGM (« Pig Gastric Mucin »), parfaitement connue en termes de composition, structure et propriétés fonctionnelles. Nous avons tout d'abord défini puis validé les modèles *in vitro* pour quantifier directement ou indirectement la force d'interaction entre *L. lactis* et PGM. Nous avons ensuite identifié puis caractérisé les déterminants physico-chimiques et biologiques mis en jeu, à la fois au niveau de la bactérie (propriétés de surface, composés spécifiques) et de la mucine (O-glycannes avec fractions acide et neutre), en collaboration avec l'Institut MICALIS de Jouy-en-Josas et l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle de Villeneuve d'Ascq. La finalité de nos travaux s'inscrit dans de nouvelles voies d'exploitation de *L. lactis* dans le domaine alimentaire (aliments fonctionnels, probiotiques) ou médical (vaccins, système de délivrance de molécules thérapeutiques).

Partie I – Synthèse bibliographique



1. Bactéries lactiques

1.1. Généralités

Les bactéries lactiques (BL) sont utilisées par les producteurs de lait depuis 65 millions d'années (Tailliez, 2001). Cette utilisation s'est accentuée, vers 8000 ans avant J.-C, lorsque l'homme est passé du statut de chasseur - cueilleur à celui d'éleveur. Les premiers vases perforés de petits trous servant au caillage du lait, retrouvés sur les rives de Neuchâtel, datent de 3000 ans avant J.-C. Ainsi, dès cette époque, en Egypte, en Mésopotamie ou en Macédoine, l'homme sait contrôler le phénomène de caillage du lait. Très rapidement, les BL s'avèrent utiles à l'homme et contribuent à la production de nombreux aliments fermentés. Le fromage, le pain, le vin et la choucroute sont obtenus dans les régions tempérées, alors que les produits à base de céréales, de tubercules, de poisson ou de viande sont préparés dans les régions tropicales.

Les BL sont des bactéries à Gram positif, généralement immobiles, asporulées, anaérobies mais aéro-tolérantes, et ne possédant ni catalase (certaines souches possèdent une pseudo-catalase), ni nitrate-réductase, ni cytochrome-oxydase (Roissart & Luguët, 1994). Elles produisent l'acide lactique comme produit final principal de la fermentation des hydrates de carbone. La fermentation est dite homolactique si l'acide lactique est le produit majoritairement formé (> 90 % du pyruvate converti en lactate) et hétérolactique si d'autres composés, tels l'acide acétique, l'éthanol, le formiate et le CO₂, sont synthétisés.

Les techniques de biologie moléculaire ont permis de mettre en évidence une forte diversité génomique au sein des BL. Ces analyses ont récemment conduit à une classification selon onze genres (Atlan, *et al.*, 2000) : *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella*. D'une façon générale, ces bactéries ont des besoins complexes en facteurs de croissance : vitamines, acides aminés, peptides, bases puriques et pyrimidiques, et glucides fermentescibles. Ainsi, le lait constitue un milieu propice à leur croissance. Par extension, notons que la culture au laboratoire des BL nécessite des milieux riches (milieu MRS, par exemple, pour les lactobacilles).

Les BL contribuent à la conservation des aliments fermentés. En effet, elles provoquent l'acidification rapide de la matière première, par la production d'acides organiques,

principalement de l'acide lactique. De plus, la production massive de nombreux autres composés (acide acétique, éthanol, composés aromatiques, bactériocines, exopolysaccharides, enzymes...) augmente la durée de conservation et la sécurité sanitaire, améliore la texture, et contribue au profil sensoriel du produit final.

Avec l'avènement de la génétique moléculaire et, par la suite, de l'ingénierie métabolique (Bailey, 1991 ; Stephanopoulos, 1994), les BL font l'objet d'un intérêt croissant auprès des acteurs académiques et industriels. En effet, elles représentent de potentielles usines cellulaires, sûres et efficaces, pour un large panel de produits : utilisation pour la fermentation des aliments et des boissons, production de saveurs (Urbach, 1995), préservation (Stiles, 1996), production d'arômes (Hugenholtz, *et al.*, 2002), de bactériocines (De Vuyst & Leroy, 2007), et d'exopolysaccharides (Welman & Maddox, 2003). Les BL peuvent également être utilisées pour la synthèse de produits chimiques, comme l'acide lactique (Kwon, *et al.*, 2001), les polyols (Wisselink, *et al.*, 2002) et les vitamines B (Taranto, *et al.*, 2003). Des applications récentes des BL dans le domaine pharmaceutique ont vu le jour, notamment pour la fabrication de médicaments et l'administration orale de certains vaccins (Hanniffy, *et al.*, 2004). Les BL peuvent également entrer en compétition avec les bactéries pathogènes colonisant le tractus gastro-intestinal (R. Fuller, 1989). Ainsi, elles s'avèrent bénéfiques pour l'organisme. On parle alors de « probiotiques ».

1.2. Probiotiques

Le marché mondial des probiotiques est en forte croissance depuis le début des années 2000. Cette dynamique est notamment soutenue par le lien, de plus en plus explicite, existant entre alimentation et santé. Alors qu'en 2003, ce marché pesait 6 milliards d'euros, il a quasiment doublé en 5 ans pour atteindre 10 milliards d'euros en 2008, soit environ 10 % du marché mondial des aliments fonctionnels (Alcimed, 2009). D'après l'agence Markets and Markets, le marché mondial des probiotiques est estimé à 32,1 milliards de dollars (soit 22 milliards d'euros) pour 2014 avec une croissance de 11,7 % du marché entre 2009 et 2014. L'Europe est le premier consommateur de probiotiques, suivie par l'Asie, comptant respectivement pour 42 et 30 % (MarketsandMarkets, 2009).

Tableau 1 : Principaux probiotiques commercialisés (Grimoud, 2010).

Souches	Producteurs
<i>Bifidobacterium animalis</i> DN 173 010	Danone
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> Bb-12	Chr. Hansen, Inc.
<i>B. bifidum</i> (MF 20/5)	Seven Seas
<i>B. breve</i> strain Yakult	Yakult
<i>B. infantis</i> 35624	Procter & Gamble
<i>B. lactis</i> FK120	Fukuchan milk
<i>B. lactis</i> HN019 (DR10)	Danisco
<i>B. lactis</i> LKM512	Fukuchan milk
<i>B. longum</i> B6	Sanofi-Bio-Industries, Inc
<i>B. longum</i> BB536	Morinaga Milk Industry Co., Ltd.
<i>B. longum</i> SBT-2928	Snow Brand Milk Products Co., Ltd.
<i>B. longum</i> (SP 07/3)	Seven Seas
<i>B. species</i> 420	Danlac
<i>Enterococcus faecium</i> SF68	Cerbios Pharma
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	Ardeypharm
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CK120	Matsutani Chemical Product
<i>L. acidophilus</i> NCFB 1748	Arla Foods
<i>L. acidophilus</i> NCFM	Danisco
<i>L. acidophilus</i> 145	Danlac
<i>L. acidophilus</i> 74-2	Danlac
<i>L. acidophilus</i> DDS-1	Nebraska Cultures, Inc.
<i>L. acidophilus</i> LA-1	Chr. Hansen, Inc.
<i>L. acidophilus</i> LA-5	Chr. Hansen, Inc.
<i>L. acidophilus</i> LB	Labratoire Lacteol
<i>L. acidophilus</i> NCFM®	Rhodia, Inc.
<i>L. acidophilus</i> R0011	Institut Rosell
<i>L. acidophilus</i> SBT-2062	Snow Brand Milk Products Co., Ltd.
<i>L. bulgaricus</i> 1261	Danlac
<i>L. casei</i> 01	Chr. Hansen, Inc.
<i>L. casei</i> 744	Nutricia
<i>L. casei</i> CRL431	Chr. Hansen, Inc.
<i>L. casei</i> (Defensis) DN114 001	Danone
<i>L. casei</i> F19	Arla Foods
<i>L. casei</i> Shirota (YIT 0918)	Yakult
<i>L. casei</i> var. <i>rhamnosus</i> (Lactophilus)	Laboratoires Lyocentre
<i>L. crispatus</i> CTV05	Gynelogix
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> 2038	Meiji
<i>L. fermentum</i> RC-14	Urex Biotech
<i>L. gasseri</i> (16/8)	Seven Seas
<i>L. helveticus</i> CK60	Matsutani Chemical Product
<i>L. johnsonii</i> La-1 (Lj1)	Nestec Ltd.
<i>L. paracasei</i> CRL 431	Chr. Hansen, Inc.
<i>L. paracasei</i> F19	Arla Foods
<i>L. plantarum</i> 299V	NextFoods Probi
<i>L. plantarum</i> ATCC 8014	MicroBioLogics
<i>L. plantarum</i> L2-1	Danlac
<i>L. reuteri</i> DSM 17938	BioGaia Biologics
<i>L. reuteri</i> MM53	BioGaia Biologics
<i>L. reuteri</i> SD2112 (MM2)	Biogaia Biologics

<i>L. rhamnosus</i> 1091	Danlac
<i>L. rhamnosus</i> 271	Probi AB
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469	MicroBioLogics
<i>L. rhamnosus</i> GG (ATCC 53103)	Valio
<i>L. rhamnosus</i> GR-1	Urex Biotech
<i>L. rhamnosus</i> LB21	Norrmejerier
<i>L. rhamnosus</i> LC-705	Danlac
<i>L. rhamnosus</i> R0052	Institut Rosell
<i>L. rhamnosus</i> VTT E-97800	Research strain VTT
<i>L. sakei</i> KCTC 10755BP	Problonic, Inc
<i>L. salivarius</i> UCC118	University College Cork
<i>Lactococcus lactis</i> L1A	Norrmejerier
<i>Saccharomyces boulardii</i> Iyo	Wren Laboratories, Biocodex, autres
<i>Streptococcus thermophilus</i> 1131	Kenko-dontokoi
<i>S. thermophilus</i> F2	Danlac
<hr/>	
Mélanges	
<i>L. acidophilus</i> CL1285 & <i>L. casei</i> Lbc80r	Bio K+ International
<i>L. rhamnosus</i> GR-1 & <i>L. reuteri</i> RC-14	Chr. Hansen, Inc.
<i>S. thermophilus</i> , quatre <i>Lactobacillus</i> spp. & trois <i>Bifidobacterium</i> spp. (VSL#3)	Sigma-Tau Pharmaceuticals, Inc.
<i>L. acidophilus</i> CUL60 & <i>B. bifidum</i> CUL20	
<i>L. helveticus</i> R0052 & <i>L. rhamnosus</i> R0011	Institut Rosell
<i>Bacillus clausii</i> strains O/C, NR, SIN, et T	Sanofi-Aventis

Un panel d'experts des commissions « Food and Agriculture Organization of the United Nations » et de l'organisation mondiale de la santé (WHO) a défini en 2001 les probiotiques comme étant des « **microorganismes vivants, qui, administrés en quantité suffisante, confèrent des effets bénéfiques pour son hôte au-delà de leurs valeurs nutritionnelles** ». Il existe de nombreux microorganismes correspondant à cette définition : la levure *Saccharomyces boulardii*, la souche d'*Escherichia coli* Nissle 1917, les bifidobactéries, diverses souches de BL (lactobacilles, quelques souches de lactocoques). Les principales souches probiotiques commercialisées sont présentées dans le Tableau 1.

Les effets des probiotiques sont multiples. Ils agissent non seulement sur l'intestin mais aussi au niveau bucco-dentaire (Meurman & Stamatova, 2007 ; Maria Carmen Collado, *et al.*, 2009) ou vaginal. Il a été démontré que les probiotiques modulent la flore intestinale et/ou inhibent la colonisation de l'intestin par les bactéries pathogènes (Michael de Vrese & Schrezenmeir, 2008). De même, la translocation de ces dernières à travers la paroi intestinale et l'infection résultante des autres organes sont limitées. Enfin, les probiotiques peuvent exercer une influence bénéfique en stimulant et en modulant la réponse immunitaire. Dans la cavité buccale, les effets généraux observés (compétition pour la colonisation, interactions

entre espèces, rôle immuno-modulateur) sont, sans nul doute, similaires à ceux décrits pour le tractus gastro-intestinal (Meurman & Stamatova, 2007).

Le mode d'action des probiotiques sur la santé peut se décliner selon trois axes majeurs (Lebeer, *et al.*, 2008). Tout d'abord, comme mentionné précédemment, certains probiotiques peuvent **exclure ou inhiber les bactéries pathogènes**. Ce mécanisme d'action est bien étudié, avec une littérature sur le sujet abondante et variée (Servin, 2004 ; Lebeer, *et al.*, 2008), même si la compréhension au sens mécanistique reste parcellaire. Le deuxième mécanisme d'action décrit consiste à **renforcer la fonction barrière de l'épithélium intestinal**, en modulant les différentes voies de signalisation qui conduisent, par exemple, à l'induction de mucus (Mack, *et al.*, 2003) et la production de défensines (Schlee, *et al.*, 2007 ; Schlee, *et al.*, 2008), à l'amélioration des jonctions serrées fonctionnelles entre les cellules épithéliales (Seth, *et al.*, 2008) et à la prévention de l'apoptose (Yan, *et al.*, 2007). Le troisième mode d'action consiste à **moduler la réponse immunitaire de l'hôte**. Il en résulte des effets locaux aussi bien que systémiques (Smits, *et al.*, 2005). Bien qu'il existe des preuves substantielles pour chacun de ces mécanismes d'action, *in vitro* et *in vivo* chez l'animal, les résultats des études cliniques chez l'Homme restent contrastés (Goldin & Gorbach, 2008). Une meilleure compréhension des interactions entre les bactéries probiotiques et l'hôte est donc nécessaire pour optimiser leur application.

De plus, les effets bénéfiques étant spécifiques d'une souche, et de ses caractéristiques, il est essentiel de définir des modalités d'utilisation (fabrication, administration) garantissant le maintien de ces fonctionnalités. Par conséquent, il est nécessaire de se doter de critères de sélection stricts : (i) stabilité phénotypique et génotypique ; (ii) résistance aux stress gastrique et biliaire ; (iii) adhésion aux tissus intestinaux ; (iv) production de substances antimicrobiennes ; (v) capacité à inhiber les bactéries pathogènes dans l'intestin ; (vi) capacité à moduler la réponse immunitaire (Tuomola, *et al.*, 2001). En effet, afin d'exercer leurs effets bénéfiques sur la santé de l'hôte, les microorganismes probiotiques doivent survivre en nombre suffisamment élevé et coloniser le tractus gastro-intestinal, du moins de manière transitoire. Une condition préalable est alors **l'adhésion à la muqueuse épithéliale** (voir paragraphe I-3).

1.3. *Lactococcus lactis*

Lactococcus lactis est la principale bactérie composant les starters utilisés dans l'industrie et l'artisanat laitiers, pour l'élaboration d'une large gamme de produits (crèmes aigres, fromages à pâte molle, fromages durs et demi-durs...). Ces ferments lactiques jouent un rôle-clé dans la qualité de ces produits, notamment en ce qui concerne la durée de conservation, la préservation et la qualité sensorielle (Smit, *et al.*, 2005). La quantité et la diversité des informations recueillies (données de séquences génomiques, macro-cinétiques et physiologiques, aspects technologiques), ainsi que le développement d'outils de génétique moléculaire et « omiques », font aujourd'hui de *L. lactis* un microorganisme modèle pour les bactéries à Gram positif et, en particulier, pour les BL (Kok, *et al.*, 2005 ; Mierau & Kleerebezem, 2005). De plus, *L. lactis*, décrit comme un organisme GRAS (« Generally Recognized As Safe »), est couramment exploité pour des applications d'usine cellulaire, pour la production de protéines hétérologues ou comme système de délivrance de molécules thérapeutiques dans le tractus gastro-intestinal (Norton, *et al.*, 1995 ; Steidler, *et al.*, 2000 ; Kunji, *et al.*, 2005).

Historiquement, trois phénotypes différents de *L. lactis* ont été identifiés, *L. lactis* ssp. *lactis*, *L. lactis* ssp. *cremoris*, et *L. lactis* ssp. *lactis* biovar diacetylactis (Schleifer, *et al.*, 1985). Ces deux sous-espèces et ce biovar sont taxonomiquement différenciés par quelques caractéristiques phénotypiques. *L. lactis* ssp. *lactis* produit de l'ammoniac à partir de l'arginine et est tolérant à 40 °C et à une forte salinité (NaCl 4 % (m/v)). En revanche, *L. lactis* ssp. *cremoris* est incapable de produire de l'ammoniac à partir de l'arginine et se caractérise par une faible tolérance à des températures et des concentrations en sel élevées. Certaines souches de *L. lactis* ssp. *lactis* sont capables de fermenter le citrate et de produire du diacétyl (composé possédant la note caractéristique de beurre). Ces dernières sont alors dénommées *L. lactis* ssp. *lactis* biovar diacetylactis (Schleifer, *et al.*, 1985).

La diversité génétique naturelle de *L. lactis* a récemment été mise en évidence (Van Hylckama Vlieg, *et al.*, 2006 ; Rademaker, *et al.*, 2007 ; Siezen, *et al.*, 2007). Avec **le lait fermenté, les végétaux** représentent un biotope important des lactocoques. Les souches de *L. lactis* isolées à partir de plantes sont génétiquement proches des souches dérivées du lait, mais elles possèdent des caractéristiques supplémentaires. Citons la capacité à fermenter une plus large diversité de glucides, une plus forte tolérance aux stress et également l'aptitude à former des saveurs différentes (Nomura, *et al.*, 2006 ; Tanous, *et al.*, 2006 ; Siezen, *et al.*,

2007). Enfin, quelques isolats cliniques de *L. lactis* sont rapportés dans la littérature (Elliott, *et al.*, 1991). Passerini *et al.* (Passerini, *et al.*, 2010) ont décrit plus récemment la diversité génétique et génomique au sein d'une collection de 36 souches (*L. lactis* ssp. *lactis*) isolées à partir de biotopes variés. Les auteurs ont proposé une nouvelle classification, basée sur la séparation écologique entre des souches « domestiquées » et « environnementales », ces dernières étant principalement impliquées dans la diversité génétique observée au sein de la sous-espèce *lactis*. En termes de capacités adhésives, cette biodiversité se traduit notamment par une variabilité des propriétés physico-chimiques de surface (charge, hydrophobie), ainsi que décrit par Giaouris *et al.* (Giaouris, *et al.*, 2009) sur un panel de 50 souches naturelles de *L. lactis* d'origine (laitière, végétale, animale) et de sous-espèce (*lactis* vs. *cremoris*) différentes.

1.3.1. *L. lactis* pour la délivrance d'antigènes et de protéines d'intérêt médical

Au cours des deux dernières décennies, des progrès significatifs ont été réalisés dans le domaine de la génétique et des systèmes d'expression de protéines chez les lactocoques (Nouaille, *et al.*, 2003 ; Mills, *et al.*, 2006). Par conséquent, de nouvelles applications de *L. lactis* ont émergé pour l'expression protéique ainsi que pour la délivrance de gènes, de vaccins ou de molécules d'intérêt médical (Norton, *et al.*, 1995 ; Bahey-El-Din, *et al.*, 2010). La capacité d'administration par voie mucoale représente un avantage significatif pour l'utilisation de vecteurs à base de *L. lactis*. Les muqueuses représentent une voie d'entrée importante pour de nombreux agents pathogènes. En conséquence, l'établissement de l'immunité mucoale spécifique (principalement des anticorps IgA sécrétoires) par la vaccination ciblée (muqueuse orale, nasale, vaginale ou rectale) contre les bactéries pathogènes peut garantir une éradication rapide et efficace de l'infection. Par ailleurs, outre sa simplicité, la vaccination par voie mucoale a la capacité de provoquer des réponses à la fois de la muqueuse et du système immunitaire (Neutra & Kozlowski, 2006).

Du fait de son innocuité, *L. lactis* offre un intérêt tout particulier en tant que vecteur « sûr » pour délivrer des molécules thérapeutiques. *L. lactis* est non invasif et, de ce fait, les risques sont limités quant au déclenchement d'effets secondaires au niveau de l'immuno-tolérance ou en cas d'une utilisation prolongée (Nouaille, *et al.*, 2003). En outre, les cellules de *L. lactis* sont similaires en taille aux microparticules de délivrance des vaccins, qui sont connues pour être reprises par les cellules M de la muqueuse intestinale (Challacombe, *et al.*,

1992 ; Robinson, *et al.*, 2004). La présentation de l'antigène au système immunitaire sous la forme de particules biologiques de type « lactocoques » limite le développement de l'immuno-tolérance de l'hôte, qui est communément observée lors d'une administration orale d'antigènes solubles (Wold, *et al.*, 1989). Par ailleurs, *L. lactis* ne suscite qu'une faible réaction immunitaire contre lui-même malgré sa capacité à agir comme immuno-adjuvant (Robinson, *et al.*, 1997 ; Wells & Mercenier, 2008).

La première tentative d'utilisation de *L. lactis* comme vecteur mucosal a été réalisée avec un lactocoque recombinant « mort » produisant un antigène protecteur (PAC) de *Streptococcus mutans* sous forme d'une protéine attachée à la paroi cellulaire. Des souris immunisées oralement avec cette souche recombinante ont développé un sérum PAC-spécifique d'IgG et des anticorps de la muqueuse IgA (Iwaki, *et al.*, 1990). Ces résultats montrent pour la première fois que *L. lactis* peut être utilisé comme vecteur vaccinal. Toutefois, le premier rapport de l'utilisation de *L. lactis* « vivant » pour délivrer un antigène a été publié par Wells *et al.* (Wells, *et al.*, 1993) qui ont utilisé une souche de *L. lactis* recombinante produisant le fragment C du tétanos (TTFC) pour immuniser des souris par injection sous-cutanée contre la toxine tétanique. Ces mêmes auteurs ont évalué ultérieurement chez la souris l'effet du mode d'administration (voie orale ou nasale) du vaccin vivant produisant TTFC (Norton, *et al.*, 1997). L'immunisation par voie orale a entraîné une réponse plus faible que par voie nasale (concentrations du sérum d'IgG et des anticorps IgA), même si l'efficacité protectrice contre la toxine tétanique est restée inchangée.

La plupart des études décrites à ce jour sur *L. lactis* comme vecteur vaccinal se focalisent sur la production de TTFC ou d'un antigène de type 16 du papillomavirus humain (HPV-16) (antigène E7). Toutefois, le nombre de travaux relatifs à l'utilisation de lactocoques recombinants comme vaccin vivant ne cesse de croître (Bermúdez-Humarán, 2009). A titre d'exemple, l'administration orale de *L. lactis* qui sécrète l'interleukine humaine 10 (hIL-10) pour la prévention et le traitement des maladies inflammatoires de l'intestin a fait l'objet d'essais cliniques récents (Braat, *et al.*, 2006 ; Steidler, *et al.*, 2009).

1.3.2. *L. lactis* comme souche probiotique

Les BL souvent utilisées comme probiotiques sont des souches de lactobacilles, initialement isolées de l'intestin humain et dont les effets bénéfiques pour la santé ont été décrits (Deshpande, *et al.*, 2011). En revanche, il n'existe que peu d'études sur l'activité

probiotique de *L. lactis*, du fait de sa faible résistance supposée aux stress rencontrés dans le tractus gastro-intestinal (bas pH, présence de sels biliaires). Toutefois, plusieurs travaux ont montré la possibilité de persistance de *L. lactis* chez l'Homme ou chez l'animal (Grahn, *et al.*, 1994 ; Schlundt, *et al.*, 1994 ; Klijn, *et al.*, 1995). De nombreuses souches de lactocoques étant traditionnellement utilisées comme « starter » dans la fabrication des fromages et d'autres produits laitiers fermentés, l'établissement de propriétés probiotiques chez *L. lactis* pourrait conduire au développement de nouveaux aliments fonctionnels à visée « biothérapeutique » (Yadav, *et al.*, 2009). Quelques exemples de la littérature traitent de cette problématique. Ainsi, certaines souches de lactocoques d'origine laitière présentent des propriétés probiotiques potentielles comme *L. lactis* ssp. *lactis* NCC2211 et NIAI527 (Kimoto, *et al.*, 1999 ; Comelli, *et al.*, 2002). Par ailleurs, il a été montré que la souche *L. lactis* ssp. *lactis* HV219 est résistante aux conditions hostiles rencontrées dans le tractus gastro-intestinal et se lie aux cellules Caco-2 (Todorov, *et al.*, 2007). Kimoto *et al.* (Kimoto, *et al.*, 2004) ont également révélé que *L. lactis* G50 présente une activité immuno-modulatrice qui améliore la réponse immunitaire et diminue significativement le taux sérique total d'anticorps IgE chez la souris, lors d'une administration par voie orale. Les tests de criblage pour la sélection de BL probiotiques chez la carpe adulte ont permis d'isoler deux souches *L. lactis* h2 et h47, dotées d'une forte résistance à l'acide cholique et d'une activité antibactérienne élevée contre les pathogènes des poissons (Hagi & Hoshino, 2009). Dans l'optique d'un meilleur contrôle des mammites bovines, il a été montré que l'administration de *L. lactis* DPC3147 dans la glande mammaire permet de stimuler la réponse immunitaire locale de l'hôte (Beecher, *et al.*, 2009).

Par ailleurs, la souche *L. lactis* ssp. *lactis* CV56, isolée à partir de sécrétions vaginales chez la femme en bonne santé, présente non seulement une activité antimicrobienne élevée, du fait de la production de la bactériocine nisine A, mais également une plus forte capacité d'adhésion aux cellules épithéliales vaginales que d'autres lactocoques, tels que la souche de référence *L. lactis* MG1363. Le séquençage récent du génome de *L. lactis* CV56 offre désormais des informations précieuses sur la diversité génomique et métabolique, ainsi que sur les propriétés probiotiques et adaptatives de *L. lactis* dans différents environnements (Gao, *et al.*, 2011).

2. Composition, structure et fonctions de la couche de mucus : rôle des mucines

2.1. Couche de mucus

Les termes « mucus », « muqueuse » et « mucines » sont apparus il y a plusieurs siècles dans le vocabulaire médical. Le concept de « rôle protecteur des organes creux », attribué à la sécrétion de mucus et à ses constituants les plus caractéristiques, les mucines, est donc très ancien, mais reste toujours d'actualité. Le mucus est un gel très hydraté (95% d'eau) qui recouvre la lumière des organes creux de l'organisme, tels que le tractus digestif, les voies respiratoires ou l'appareil génital. Il y assure de nombreuses fonctions comme la lubrification, le maintien d'une couche hydratée sur l'épithélium, l'établissement d'une barrière aux agents pathogènes et substances toxiques. Il s'agit également une couche perméable aux gaz et aux nutriments qui peuvent être adsorbés par l'épithélium sous-jacent (Allen, 1981 ; Neutra & Forstner, 1987). En plus de ses fonctions de protection, le mucus est également impliqué dans de nombreux processus pathologiques tels que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, la lithogénèse biliaire et les cancers. Le mucus est aussi la première barrière avec laquelle les nutriments et les médicaments doivent interagir pour être absorbés et avoir accès au système circulatoire et aux organes cibles.

Le mucus est composé principalement d'eau, mais il contient aussi des sels, des lipides tels que les acides gras, les phospholipides et le cholestérol, des facteurs de croissance et des protéines de « défense » comme le lysozyme ou les immunoglobulines. Toutefois, l'élément principal qui est responsable de ses propriétés visqueuses et élastiques est une famille de glycoprotéines : les mucines. Elles sont le plus souvent synthétisées par des cellules épithéliales spécialisées dans les fonctions de stockage et de sécrétion. **Deux formes de mucus co-existent : un gel insoluble dans l'eau adhérent à la muqueuse et, en extrême surface, une couche visqueuse hydrosoluble.** Les mucines sécrétées (formant le gel) sont produites par des cellules à mucus spécifiques ou cellules caliciformes que l'on retrouve tout au long du tractus gastro-intestinal. Les autres cellules sécrétrices majoritaires sont les « cellules de Paneth », cellules du système immunitaire intestinal, qui sont situées à côté des cellules souches en profondeur dans les cryptes de l'intestin grêle. Il existe chez l'Homme cinq mucines sécrétées oligomérisées (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 et MUC19) et une mucine sécrétée non oligomérisée (MUC7) (Thornton, *et al.*, 2008), qui sont produites dans

différentes régions du tractus gastro-intestinal (Tableau 2). En plus, les mucines transmembranaires à la surface des cellules produites dans le tractus gastro-intestinal comprennent MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16 et MUC17 (Hattrup & Gendler, 2008) (Tableau 2).

Tableau 2. Type de mucines dans le tractus gastro-intestinal de l'Homme, en fonction du compartiment considéré (McGuckin, *et al.*, 2011).

Tissu	Mucines sécrétées formant le gel	Mucines transmembranaires à la surface des cellules
Cavité buccale	MUC5B MUC7 MUC19	MUC1 MUC4 MUC16
Estomac	MUC5AC MUC6	MUC1 MUC16
Intestin grêle	MUC2	MUC1, MUC3A MUC3B, MUC4 MUC12, MUC13 MUC15, MUC16 MUC17
Gros intestin	MUC2 MUC5AC MUC6	MUC1, MUC3A MUC3B, MUC4 MUC12, MUC13 MUC15, MUC16 MUC17

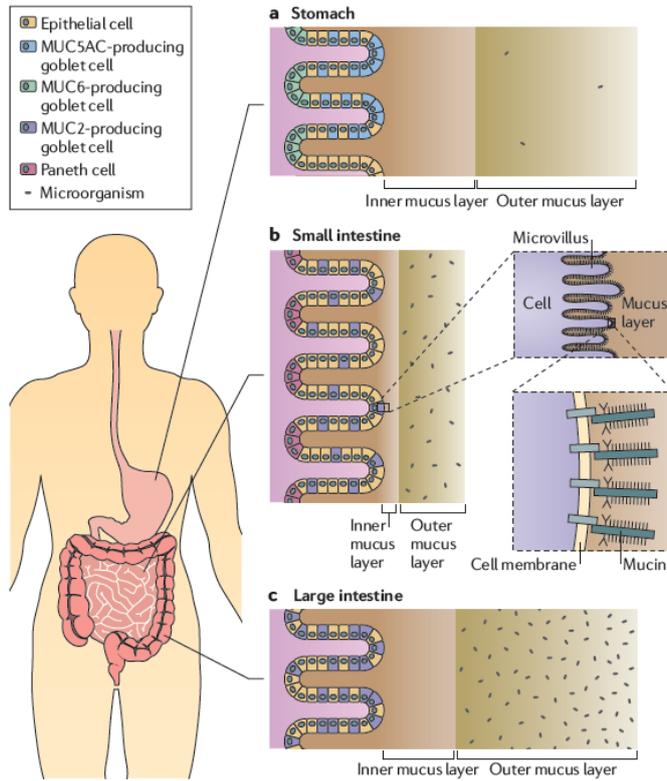
Le mucus sécrété est lui-même constitué de deux couches (Figure 1A) : (i) une couche interne mince, qui est stérile et difficile à éliminer et (ii) une couche externe colonisée par le

microbiote et, elle, plus labile. Dans l'estomac, la couche externe contient un faible nombre de bactéries et mesure ~ 120 µm d'épaisseur pour le modèle murin (rat/souris), tandis que la couche interne a une épaisseur d'environ 100-150 µm. Le mucus, produit par les cellules à mucus, est composé des mucines MUC5AC et MUC6.

Au niveau de l'intestin grêle (Figure 1B), la couche de mucus, composée principalement de MUC2 et produite par les cellules à mucus et les cellules de Paneth, est plus mince (épaisseur de 15-30 µm et de 100-400 µm pour les couches interne et externe, respectivement). Le nombre de bactéries est modéré, en raison du temps de séjour faible, des stress acide (dans l'estomac) et intestinal (forte concentration en sels biliaires), ce qui limite la croissance des microorganismes. L'épaisseur de la couche de mucus augmente dans la partie distale (iléon), avec en parallèle une plus forte colonisation microbienne (environ 10^5 - 10^7 bactéries par gramme de fèces).

La couche de mucus dans le côlon, constituée de MUC2 et essentiellement produite par les cellules à mucus, atteint une épaisseur maximale (~ 100 µm et ~ 700 µm pour les couches interne et externe, respectivement). La colonisation microbienne est forte (10^{10} – 10^{12} par gramme de fèces), du fait (i) du temps de séjour long, (ii) de la concentration faible en sels biliaires, (iii) de la présence de sources de substrats endogènes (O-glycannes des mucines) et (iv) de la rareté et des faibles sécrétions des cellules de Paneth (qui produisent les peptides antimicrobiens ou défensines). Par conséquent, l'environnement dans le côlon (qui est un organe fermentatif analogue au rumen chez les ruminants) est favorable à la mise en place et au maintien d'un consortium microbien dense et complexe. Dans une étude récente (Johansson, *et al.*, 2008), les auteurs montrent que le mucus colique chez la souris est constitué de deux couches de composition protéique semblable, avec Muc2 comme composant structurel majeur. La couche interne est dense, fortement attachée à l'épithélium, et dépourvue de bactéries. En revanche, la couche externe, plus labile et fortement colonisée, a une structure plus étendue en raison de clivages protéolytiques de Muc2. Les auteurs ont également démontré le rôle de Muc2 et de la fonction barrière associée vis-à-vis de la prévention des maladies inflammatoires de l'intestin.

(A)



(B)

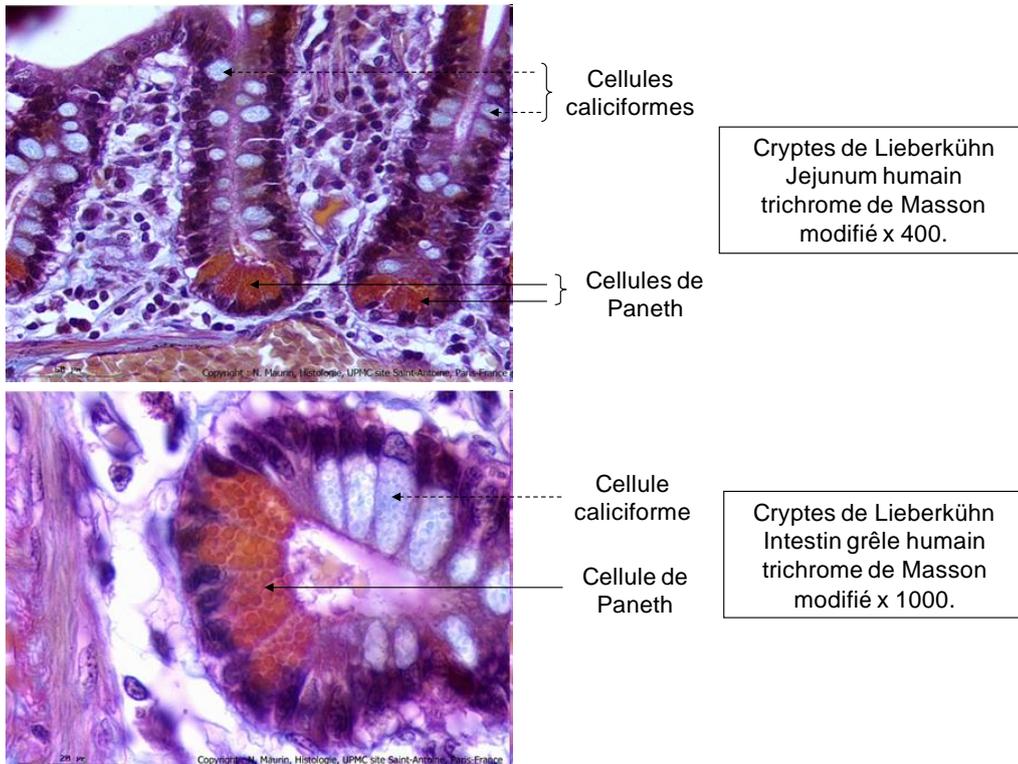


Figure 1. (A) Caractéristiques de la couche de mucus et de la muqueuse intestinale pour l'estomac, l'intestin grêle et le côlon (McGuckin, *et al.*, 2011) ; (B) Images histologiques montrant les cellules à mucus (ou cellules caliciformes) et les cellules de Paneth dans la muqueuse intestinale (site d'histologie de l'Université Pierre et Marie Curie de Paris).

2.2. Structure et propriété des mucines

2.2.1. Structure des mucines

Les différentes mucines rencontrées chez les mammifères partagent un certain nombre de caractéristiques communes (Dekker, *et al.*, 2002) :

- Il s'agit de polymères de grande taille, composés de monomères de glycoprotéines hautement glycosylées : chaque monomère, pouvant avoir une masse moléculaire supérieure à 10^6 Da, **est formé d'un noyau central peptidique entouré d'une série d'oligosaccharides** disposés en forme d'écouvillon.
- Les chaînes latérales glucidiques représentent classiquement 80-85% du poids de la mucine. Elles sont constituées de galactose (Gal), de fucose (Fuc), de N-acétyl-galactosamine (GalNAc), de N-acétyl-glucosamine (GlcNAc) et d'acide sialique. En général, le point de branchement est constitué de N-acétyl-galactosamine, attaché à la protéine par une liaison éther, qui est le résultat de la réaction entre la position α -1 du groupement hydroxyle et le groupement hydroxyle des acides aminés sérine ou thréonine (Strous & Dekker, 1992). Le nombre de résidus de sucre dans chacune des chaînes latérales varie de 2 à 20 ; en outre, les chaînes peuvent avoir des sous-ramifications.
- La région glycosylée du noyau peptidique contient de nombreuses répétitions de séquences appariées (chaque séquence étant composée de 6 à 169 acides aminés, en fonction du type de mucine), contenant des quantités importantes de sérine, de thréonine et de proline, auxquelles sont attachés les oligosaccharides. Les résidus de sérine et de thréonine dominent la composition en acides aminés, ils constituent 25-40% des acides aminés totaux. Dans une solution aqueuse, le cœur protéique est plutôt hydrophobe, alors que les oligosaccharides des chaînes latérales sont hydrophiles. Dans ce cas, si la densité et la longueur des chaînes latérales sont suffisamment élevées, les autres molécules n'entrent en contact qu'avec ces dernières, tandis que les segments du squelette restent inaccessibles.
- Les régions non ou peu glycosylées du noyau peptidique, riches en acides aspartique et glutamique, contiennent beaucoup de cystéine et peuvent être assimilées à des zones hydrophobes. Ces régions, qui possèdent des domaines ayant une séquence semblable à celle du facteur de Willebrand (vWF) C et D, et des domaines du nœud de cystine (Perez-Vilar & Hill, 1999), sont impliquées dans les processus de dimérisation *via* la formation de ponts disulfures puis de polymérisation des dimères pour former des multimères (Sheehan, *et al.*,

2004) (Figure 2). La rareté des chaînes glucidiques dans ces régions (relativement peu de liaisons O-glycosidiques et quelques sites de liaison N-glycosidique), par contraste avec les régions hautement glycolysées, les rend sensibles aux protéases bactériennes et endogènes.

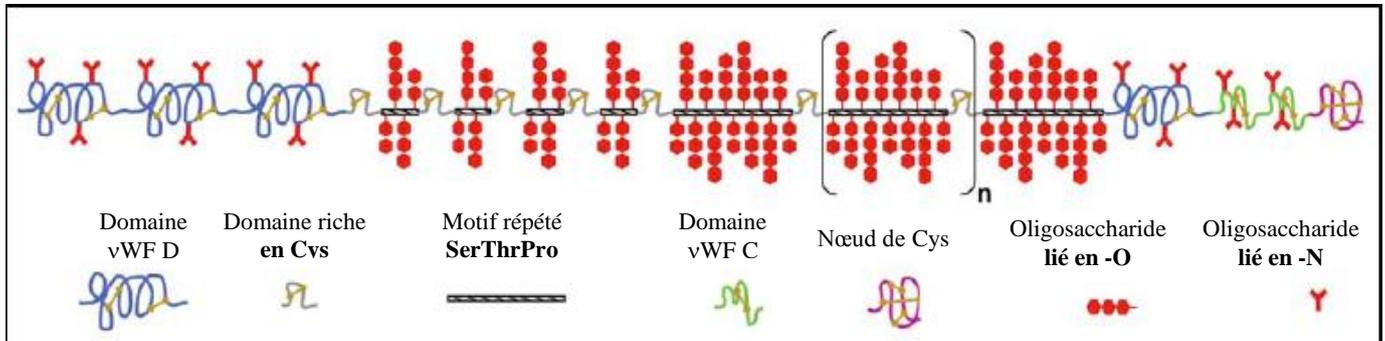


Figure 2. Monomère de mucine – exemple de PGM (« Pig Gastric Mucin ») (Dekker, *et al.*, 2002).

Certains auteurs ont étudié plus précisément la structure et la diversité des oligosaccharides présents dans le mucus gastrique de porc (Ohara, *et al.*, 1993 ; Karlsson, *et al.*, 1997 ; Nordman, *et al.*, 1997). Nordman *et al.* ont ainsi identifié, en fonction de l'origine des tissus (cardia, corpus et antrum), différentes populations variant en densité, taille et profil de glycosylation (fractions acide et neutre). Le nombre moyen de résidus monosaccharidiques par chaîne latérale est de l'ordre de 10, les monosaccharides majeurs étant GalNAc, GlcNAc, Fuc, Gal et mannose. Ce dernier reflète probablement la présence d'oligosaccharides liés par des N-glycosylations. Le niveau d'acide sialique étant faible, les auteurs ont pu relier préférentiellement les différences d'acidité à des variations du degré de sulfatation. Dans une étude ultérieure, l'équipe s'est focalisée sur les oligosaccharides neutres à partir de ces mêmes populations de mucines. Les auteurs ont ainsi mis en évidence leur diversité en termes de composition (nature et enchaînement des résidus monosaccharidiques), même si certaines structures caractéristiques prédominent (Karlsson, *et al.*, 1997).

2.2.2. Propriétés physiques des mucines en solution

Les mucines sont difficiles à caractériser, en raison de leur poids moléculaire élevé et de leur haut degré de glycosylation. Les premières études biophysiques, réalisées par Bansil *et al.* (Bansil, *et al.*, 1995) et Harding (Harding, 1989), principalement par des méthodes de diffusion de la lumière, ont montré que les mucines (mucines sous-maxillaires, respiratoires

ou cervicales humaines) pouvaient être représentées comme une « bobine » aléatoire ayant un rayon de giration d'environ 100 nm. Des études de spectroscopie RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) sur MUC1 (Otvos & Cudic, 2003) ont suggéré que la structure de la mucine repose sur très peu de structures en hélice α , une faible quantité de feuillets β et surtout une bobine aléatoire. La taille importante de la mucine est, par ailleurs, un avantage pour l'imagerie moléculaire directe. La microscopie électronique en transmission, utilisée par Fiebrig *et al.* (Fiebrig, *et al.*, 1995), révèle des fibres d'environ 400 nm de longueur pour la mucine gastrique de porc (PGM). Plus récemment, l'étude en microscopie à force atomique (AFM) sur une mucine oculaire (Round, *et al.*, 2002) montre des fibres individuelles ayant une large distribution en termes de longueur. Alors que la plupart des fibres mesurent entre 200 et 600 nm de longueur, la queue de la distribution s'étend jusqu'à 1500 nm. A partir de ces mêmes images, les auteurs ont évalué la longueur de persistance à environ 36 nm, ce qui confirme la nature étendue du polymère. Dans une autre étude par AFM sur la même mucine oculaire, Brayshaw *et al.* (Brayshaw, *et al.*, 2004) ont démontré sa nature multimérique, par observation *in situ* de la dépolymérisation sous l'effet d'un traitement par le dithiothréitol (DTT). McMaster *et al.* (McMaster, *et al.*, 1999) ont, eux, examiné la mucine oculaire en mode « tapping » et milieu liquide et ont noté des variations régulières de hauteur tout au long de la fibre. Ces variations ont été interprétées comme correspondant aux régions glycosylées de la mucine. Round *et al.* (Round, *et al.*, 2002) ont pu corrélérer les conformations aux différents degrés de glycosylation, par imagerie AFM des fractions obtenues sur un gradient de chlorure de césium. Toutefois, les chaînes de sucre sont trop mobiles dans le solvant pour pouvoir être entièrement déployées par AFM. En effet, l'imagerie AFM exige un degré élevé d'immobilisation sur le support, de sorte que la pointe peut avoir pénétré dans les enchevêtrements des chaînes oligosaccharidiques, sans les détecter. L'imagerie de PGM, une fois déglycosylée à hauteur d'environ 50 %, a montré que les portions déglycosylées repliées forment des structures globulaires compactes (Hong, *et al.*, 2005). Ainsi, les sucres sont importants pour le maintien de la conformation de la mucine.

La conformation des mucines dépend également de facteurs physico-chimiques tels que le pH et la force ionique. Par exemple, les études réalisées en dynamique de diffusion de la lumière (Cao, *et al.*, 1999) ont montré la transition d'une conformation isotrope aléatoire de type bobine à pH 7 à une conformation anisotrope aléatoire de type bobine à pH 2. A pH 7, les mucines présentent une longueur de 390 nm avec une longueur de persistance de 10 nm alors qu'à pH 2, la longueur ainsi que la longueur de persistance augmentent jusqu'à 450 nm

et 43 nm, respectivement. Dans une récente étude couplant des mesures de viscosité et de dichroïsme circulaire, (Lee, *et al.*, 2005) ont révélé la modularité de la conformation de PGM en fonction du pH, les variations observées étant attribuées aux modifications des domaines hydrophobes à faible pH. Les auteurs ont également mesuré le potentiel zêta de PGM et ont estimé que son point isoélectrique se situe entre 2 et 3.

2.2.3. Propriétés adhésives des mucines

La tendance des autres substances à adhérer aux mucines, décrite sous le nom de muco-adhésion, suggère que ces glycoprotéines autorisent **des interactions électrostatiques, hydrophobes, la formation de liaisons hydrogène, ainsi que des interactions de type lectines/saccharides** (Harding, *et al.*, 1999).

Les mucines contiennent *a priori* de nombreux groupements réactifs, nécessaires à la formation de liaisons hydrogène, tels que les fonctions hydroxyles des chaînes latérales des oligosaccharides, les groupements aminés dans le noyau peptidique central ainsi que certaines fonctions carboxyliques ou sulfates dans les segments terminaux des chaînes latérales. Par conséquent, il est raisonnable de considérer la liaison hydrogène comme la première source d'interaction des mucines avec d'autres molécules. Toutefois, il faut rappeler ici que les milieux aqueux ont un effet important sur la formation de liaisons hydrogène entre les chaînes de polymères. En effet, la concentration molaire des molécules d'eau dans les solutions aqueuses est très élevée (environ 55 M) et ces molécules sont elles-mêmes de très bons accepteurs ou donneurs de liaisons hydrogène. Ainsi, la formation de liaisons hydrogène entre deux segments de polymères en solution est un processus en concurrence directe avec la formation de liaisons hydrogène entre les polymères et l'eau (Zeegers-Huyskens & Huyskens, 1991). Par conséquent, les fonctions hydroxyles dans les chaînes latérales peuvent, dans certains cas, ne pas être des sites d'interactions importants (Zeegers-Huyskens & Huyskens, 1991), de même pour les groupements situés dans le noyau central des mucines. En effet, en raison de la structure en écouvillon, les segments du noyau central sont largement recouverts par les chaînes latérales hydrophiles et, donc, peu disponibles pour nouer des interactions inter-chaînes (Wataoka, *et al.*, 1999). Enfin, les groupements carboxyliques et sulfates au niveau terminal des chaînes latérales peuvent jouer un rôle important dans la formation des liaisons hydrogène (Andrew & Simon, 1999). L'acide sialique ainsi que les saccharides sulfatés sont chargés négativement à partir d'un pH supérieur à 3 (MacAdam, 1993), et leur

capacité de formation des liaisons hydrogène est supérieure à celle de l'eau. En outre, toujours en raison de la structure en écouvillon, les résidus terminaux de sucres dans les chaînes latérales sont exposés en extrême surface, ils sont donc les sites d'interaction les plus probables.

Les mucines possèdent, par ailleurs, des groupements hydrophobes, notamment au niveau du noyau central des protéines, de sorte que des interactions hydrophobes peuvent être mises en place et exploitées. L'adsorption de différentes mucines sur des surfaces hydrophobes a été étudiée (Malmsten, *et al.*, 1992 ; Rogunova, *et al.* ; 1997, Shi & Caldwell, 2000) et les données convergent vers la forte affinité des mucines pour les surfaces hydrophobes. Il a ainsi été montré que la mucine sous-maxillaire bovine pouvait s'adsorber sur une surface hydrophobe de polystyrène et ainsi la rendre hydrophile (Shi & Caldwell, 2000). Les interactions lipides/mucines sont, en outre, bien connues et caractérisées (Rogunova, *et al.*, 1997).

Comme mentionné précédemment, les molécules de mucines sont chargées négativement pour un pH supérieur à 2-3 (Allen, 1981). Certains polymères chargés positivement, tels que le chitosane (Genta, *et al.*, 1998), peuvent former des complexes poly-électrolytiques stables avec les mucines chargées négativement et ainsi garantir une forte muco-adhésion. Deacon *et al.* (Deacon, *et al.*, 1999) ont même suggéré que l'interaction entre les mucines et le chitosane pourrait être spécifique au mucus provenant de différentes régions de l'estomac. A l'inverse, il est possible de promouvoir des effets anti-adhésifs. Ainsi, une pointe AFM fonctionnalisée avec de la mucine adhère à une surface de mica en présence de cations divalents (Berry, *et al.*, 2001), mais non à cette même surface recouverte de mucine, probablement en raison de la répulsion des charges poly-électrolytiques.

Les lectines sont des protéines d'origine non immunitaire, présentes chez les animaux, les plantes et les microorganismes et qui se lient aux hydrates de carbone avec une forte spécificité (Ponchel & Irache, 1998). Récemment, les lectines ont bénéficié d'un regain d'intérêt, du fait de leur capacité à reconnaître spécifiquement et à se lier aux récepteurs de la membrane cellulaire. Les polymères conjugués de lectines sont plutôt considérés comme une catégorie secondaire de composés bio-adhésifs car ils sont conçus de manière à se lier aux cellules épithéliales et non à la couche de mucus (Lehr, 2000). Toutefois, ils conservent une forte affinité pour les mucines.

2.3. Propriété de barrière de la muqueuse en relation avec les pathologies

La muqueuse intestinale assure beaucoup de fonctions spécifiques tout au long du tractus gastro-intestinal pour permettre à la nourriture ingérée d'être digérée, absorbée et transformée avant excrétion. Ces processus doivent coexister avec la nécessité de fournir une barrière efficace, à la fois contre les microorganismes commensaux qui fermentent les matières alimentaires non digérées dans la lumière de l'intestin, et contre les pathogènes potentiels (virus, bactéries...). **Il existe trois niveaux de protection de la barrière « muqueuse » : le mucus sécrété, la couche recouvrant l'épithélium et les jonctions serrées des cellules épithéliales** (McGuckin, *et al.*, 2011).

Le gel très hydraté et visqueux de mucus est nécessairement poreux pour permettre la diffusion de macromolécules qui sont nécessaires à la sécrétion et l'absorption gastro-intestinale (le processus le plus important ayant lieu dans l'intestin grêle), mais il fournit également une barrière physique efficace contre les particules, y compris les microorganismes. Les particules virales (taille < 500 nm) peuvent *a priori* facilement diffuser au travers du mucus cervical tandis que les bactéries (taille de l'ordre de 1-2 µm) sont, elles, stoppées (Lai, *et al.*, 2007 ; Lai, *et al.*, 2009). Toutefois, il faut souligner que, lorsque de petites particules, y compris les virus, interagissent avec les composants du mucus (mucines, anticorps...), elles peuvent être piégées (Lai, *et al.*, 2007).

L'importance de cette barrière « mucus » est soulignée par des études récentes. Il a ainsi été démontré sur un modèle murin de souris que des animaux déficients en Muc2 développent des infections sévères, potentiellement mortelles, lorsqu'ils sont infectés par un pathogène de type *Escherichia coli* ou *Citrobacter rodentium* (Bergstrom, *et al.*, 2010). Ces mêmes animaux montrent, par ailleurs, une clairance retardée du parasite nématode *Trichuris muris* (Hasnain, *et al.*, 2010) et développent une inflammation intestinale spontanée (Van der Sluis, *et al.*, 2006) lors de l'exposition de l'épithélium intestinal au microbiote commensal dans des conditions où l'altération et l'absence de la couche barrière de mucus se produisent (Johansson, *et al.*, 2008). Les caractéristiques physiques du mucus, la forte dépendance de ses propriétés physico-chimiques à l'égard de facteurs environnementaux tels que la force ionique et le pH, ainsi que le changement dans la sécrétion de mucines, jouent un rôle important dans de nombreuses pathologies. De nombreuses bactéries pathogènes (*Pseudomonas*, streptocoques, pneumocoques...) possèdent des adhésines qui se lient spécifiquement au mucus, leur permettant de s'implanter dans le tractus intestinal (Scharfman, *et al.*, 1995).

Helicobacter pylori, en particulier grâce à ses adhésines et à sa capacité à résister aux bas pH, peut migrer à travers la couche de mucus de l'estomac et attaquer l'épithélium : il est ainsi la cause majeure d'ulcères au niveau gastro-duodéal (Slomiany & Slomiany, 1991). Quelques organismes parasites produisent leurs propres structures de mucus pour échapper au système immunitaire (Jain, *et al.*, 2001). Par ailleurs, la surproduction de mucus pulmonaire est impliquée dans la mucoviscidose (Boucher, 2004), la bronchite, l'asthme et les infections de l'oreille moyenne. La sous-production de mucus est également caractéristique du syndrome des yeux secs (Argüeso & Gipson, 2001) et présente dans certaines formes de maladies ulcéreuses. A noter, enfin, que l'expression et la composition du mucus sont altérées dans les cancers d'origine épithéliale (Hollingsworth & Swanson, 2004).

Vu le rôle central joué par la couche de mucus dans ces pathologies, de nombreux travaux portent aujourd'hui sur la mise au point de méthodes basées sur l'optimisation de la muco-adhésion pour une meilleure biodisponibilité des médicaments. Diverses interactions moléculaires sont ainsi exploitées comme, par exemple, les interactions poly-électrolytiques (chitosane, polyacide acrylique, etc.), les liaisons hydrogène (hydrogels) (Harding, *et al.*, 1999) ou encore les ponts disulfures (« thiomers ») (Leitner, *et al.*, 2003). La mucine peut également être utilisée comme additif à haut poids moléculaire pour améliorer l'adhésion des larmes artificielles dans le traitement du syndrome de sécheresse oculaire (Khanvilkar, *et al.*, 2001). Les applications visant à développer des nanoparticules pour de nouveaux vaccins et la thérapie génique sont également à l'étude (Michelle, *et al.*, 2004). L'anomalie des sucres dans la membrane cellulaire, liée aux mucines des cellules cancéreuses, est également étudiée comme cible potentielle de développement d'un vaccin contre le cancer (Ren & Somasundaran, 1993).

2.4. Rôle des mucines dans la fonction barrière

L'ensemble des domaines oligosaccharidiques sur la partie centrale glycosylée des mucines sécrétées représente une multiplicité de ligands potentiels pour les adhésines microbiennes et peut être utilisé comme source d'énergie par certains microorganismes commensaux présents dans la couche externe de mucus. L'identité de ces oligosaccharides peut être déterminée *via* le profil exprimé des glycosyl-transférases dans l'appareil de Golgi des cellules à mucus. Les analyses par spectrométrie de masse ont révélé que plus de 100 oligosaccharides différents sont présents chez MUC2 dans le côlon humain (Holmén Larsson,

et al., 2009). L'expression des glycosyl-transférases diffère dans les différents compartiments du tractus gastro-intestinal et peut être modulée par l'immunité innée et adaptative. La variation dans les gènes codant ces transférases résulte en une diversité des structures glucidiques de mucines dans la population humaine ; un exemple est la variété des oligosaccharides des antigènes des groupes sanguins Lewis. En plus de cette variation dans la glycosylation au sein d'une même espèce, il existe des différences considérables entre les espèces, pouvant être un facteur important de la spécificité d'espèce pour des bactéries commensales ou pathogènes (Henrissat, *et al.*, 2009).

Bien que les propriétés de la couche externe de mucus confèrent un rôle barrière efficace pour les microorganismes, les pathogènes peuvent parfois vaincre cet obstacle et atteindre la surface cellulaire. Les mucines membranaires de surface (MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16 et MUC17 (voir (Hattrup & Gendler, 2008)) et Tableau 1) jouent alors un rôle décisif dans la réponse de l'hôte. Ainsi, dans des co-cultures *in vitro* de *H. pylori* et de cellules épithéliales gastriques, il a été démontré que MUC1 est libérée en réponse à l'infection et agit donc comme un leurre pour limiter l'adhésion des bactéries à la surface des cellules (Lindén, *et al.*, 2009). Il faut souligner que cet effet de blocage par MUC1 est influencé par l'adhésion des bactéries à la mucine, mais fonctionne même lorsque les bactéries ne possèdent pas d'adhésines spécifiques. *H. pylori* exprime principalement deux adhésines interagissant avec les oligosaccharides, l'adhésine se liant aux acides sialiques (SabA) et l'adhésine ayant une affinité pour les antigènes de groupe sanguin (BabA). Ces deux adhésines varient dans leur niveau d'expression dans l'infection chez l'Homme et affectent le niveau de pathogénicité (Mahdavi, *et al.*, 2002 ; Aspholm-Hurtig, *et al.*, 2004). Lorsque *H. pylori* exprime SabA et BabA, la mucine de surface se lie à la bactérie, selon le mécanisme décrit plus haut. Toutefois, lorsque *H. pylori* n'exprime pas ces adhésines, la mucine n'est certes pas libérée mais un blocage de l'adhésion des bactéries à la surface cellulaire subsiste, vraisemblablement par encombrement stérique (Lindén, *et al.*, 2009).

De plus, la muqueuse ne doit pas être considérée comme une barrière inerte : sa composition et la libération des différentes molécules qui la composent sont modulées par de nombreux facteurs présents dans la lumière intestinale et aussi par des facteurs impliquant les systèmes nerveux, endocrinien et immunitaire. Comme vu précédemment sur *H. pylori*, l'une des stratégies déployées par la muqueuse intestinale pour se protéger de l'implantation des pathogènes est l'inhibition de l'adhésion de ces derniers à la surface épithéliale, notamment

via les mucines. En cas d'infection par *C. rodentium* chez la souris, de façon intéressante, en dépit de la diminution progressive de la plupart des mucines sécrétées et de surface, on constate une augmentation progressive de la concentration de Muc1, mécanisme mis en place pour éradiquer l'infection (Lindén, *et al.*, 2008 ; Bergstrom, *et al.*, 2010). En outre, au cours de l'infection à rotavirus, toujours chez la souris, la production de Muc2 est accrue, le profil de glycosylation modifié. Les mucines isolées des souris infectées peuvent alors neutraliser de manière efficace le virus *in vitro*. Ces résultats démontrent le rôle important de ce type de mucines dans le contrôle des infections à rotavirus (Boshuizen, *et al.*, 2005).

Dans le domaine actuellement en plein essor des probiotiques, leur rôle dans le renforcement de la barrière épithéliale intestinale a été décrit, avec la combinaison de divers mécanismes tels que l'induction de la sécrétion de mucines. Des premiers travaux (Mack, *et al.*, 1999) ont montré que, d'une part, les probiotiques *L. plantarum* 299v et *L. rhamnosus* GG étaient capables d'inhiber l'adhésion de certaines souches entéropathogènes d'*E. coli* (souche EPEC) à des cellules épithéliales humaines (lignée HT29) cultivées *in vitro* et que, d'autre part, ces probiotiques étaient capables de stimuler l'expression des ARN messagers spécifiques des mucines extracellulaires (MUC3, une mucine transmembranaire de l'intestin grêle) dans ces cellules HT29. Les travaux ultérieurs réalisés par Mack *et al.* (Mack, *et al.*, 2003) avaient pour but de définir si l'adhésion de la bactérie probiotique à la muqueuse était nécessaire à la sécrétion de mucines et si la production de mucines avait une signification biologique particulière. Les tests d'adhésion ont montré que *L. rhamnosus* GG adhère 10 fois plus que *L. plantarum* 299v, lui-même adhérant 10 fois plus que *L. acidophilus* DDH. La production de MUC3 est significativement plus élevée lorsque les cellules HT29 sont incubées avec *L. rhamnosus* GG ou *L. plantarum* 299v. *L. acidophilus* DDH ne semble pas, quant à lui, influencer cette production. Par ailleurs, un variant de la souche *L. plantarum* 299v, incapable d'adhérer aux cellules HT29, n'est pas en mesure de stimuler l'expression de MUC3. Ces données suggèrent que les probiotiques pourraient stimuler l'expression de MUC3 sous condition d'adhésion aux cellules épithéliales intestinales. Par ailleurs, l'incubation simultanée des cellules HT29 et de la souche *E. coli* EPEC, en présence de *L. rhamnosus* GG ou de *L. plantarum* 299v, empêche l'adhésion du pathogène. En revanche, le variant de la souche *L. plantarum* 299v ainsi que *L. acidophilus* DDH ont été incapables, dans des conditions similaires, d'inhiber cette même adhésion. En définitive, l'ensemble de ces résultats montre que **certaines bactéries probiotiques pourraient stimuler la production de mucines par les cellules épithéliales intestinales sous condition d'adhésion.**

Enfin, l'augmentation de la sécrétion de mucines extracellulaires serait l'un des facteurs mis en jeu dans l'inhibition par les probiotiques de l'adhésion des bactéries pathogènes.

En définitive, selon les études décrites ci-dessus, l'adhésion à la muqueuse semble une étape cruciale pour la colonisation des bactéries et un mécanisme-clé pour leur activité en tant que probiotiques, notamment pour les BL (Ouwehand, *et al.*, 1999 ; Heinemann, *et al.*, 2000 ; Servin, 2004). Les souches avec une forte capacité d'adhésion exercent un impact significatif sur la santé de l'hôte, même si les effets observés sont souvent multi-factoriels (voir la partie I - 1.2 sur les probiotiques). De cette capacité d'adhésion dépend aussi la virulence des bactéries pathogènes. En effet, elles ont besoin d'adhérer puis de s'intégrer à la muqueuse, d'atteindre l'épithélium avant de se multiplier et de déclencher l'infection (Finlay & Falkow, 1997). Dans ce cadre, la couche de mucus et, plus particulièrement, les mucines jouent un rôle central. Par conséquent, la connaissance et la quantification des interactions (physico-chimiques, mécaniques, biologiques) avec les surfaces exposées, et notamment les mucines, sont sans nul doute un aspect important, même si jusqu'alors occulté par la communauté scientifique. Nous allons maintenant présenter les mécanismes généraux mis en jeu dans l'adhésion bactérienne aux surfaces abiotiques et biotiques (approches physico-chimiques, paroi et déterminants de surface des BL, modèles d'adhésion à la muqueuse).

3. Mécanismes d'adhésion des BL à la muqueuse intestinale

3.1. Mécanismes physico-chimiques généraux, mis en jeu dans l'adhésion bactérienne à une surface solide : application aux BL

L'adhésion d'un microorganisme à une surface solide est un processus complexe qui implique deux surfaces dont l'une au moins est de nature biologique. Le rôle de l'environnement (paramètres physico-chimiques, conditions hydrodynamiques) est également essentiel. La diversité des acteurs mis en jeu et les différents types d'interactions matériau/surface microbienne, qu'elles soient spécifiques ou non spécifiques, compliquent encore l'acquisition et l'interprétation des données. Mais il faut garder à l'esprit que l'ensemble de ces interactions résulte des mêmes processus physico-chimiques élémentaires. Dans le cas des interactions spécifiques (du type ligand/récepteur), seules les forces entre des groupements très localisés à la surface des corps en présence sont prises en compte. Au contraire, pour les interactions non spécifiques, les forces appliquées sont à intégrer sur l'entière surface des entités considérées.

Dans les approches physico-chimiques classiques, les bactéries sont assimilées à des particules colloïdales idéales, sphériques et rigides, avec une surface parfaitement définie et uniforme. Les modèles de base, comme les théories DLVO (Derjaguin & Landau, 1941 ; Verwey & Overbeek, 1948) et DLVO étendue (Van Oss, *et al.*, 1986), ne prennent en compte que les interactions non spécifiques. A noter toutefois que les évolutions actuelles ont tendance à considérer et intégrer les spécificités des microorganismes (présence de flagelles, de pili ou de macromolécules adsorbées, propriétés nanomécaniques et « mollesse » de l'interface...). Selon l'approche physico-chimique, le processus d'adhésion résulte des interactions intermoléculaires s'établissant entre les surfaces du microorganisme et du support mises en jeu :

- interactions de type électrostatique ;
- interactions liées aux forces de van der Waals ;
- interactions polaires (de type acide/base de Lewis).

Toutefois, dans le cas particulier de l'adhésion des BL à la muqueuse intestinale, des contradictions apparaissent parfois dans les études réalisées, probablement en raison de la diversité des modèles d'adhésion utilisés et des hypothèses simplificatrices retenues. Certains

auteurs (Mack & Sherman, 1999 ; Kos, *et al.*, 2003) ont établi la corrélation entre adhésion et hydrophobie de la surface bactérienne. Mais, dans d'autres études (Ouwehand, *et al.*, 1999 ; Deepika, *et al.*, 2009), aucun changement significatif dans le niveau d'adhésion n'a été observé, en dépit de certaines modifications de l'hydrophobie de surface. En outre, les propriétés physico-chimiques, liées à la présence de composés précis sur la paroi bactérienne (nature, structure, conformation), peuvent évoluer en fonction des conditions de culture et du type de souche (Giaouris, *et al.*, 2009). En particulier, **l'adhésion des BL au mucus est régie par des composants (protéines, acides (lipo)-téichoïques, polysaccharides) agissant seuls mais également de manière coordonnée, ce qui se traduit par la complexité des interactions mises en jeu.** Il est alors crucial de se doter d'outils et de méthodes qui permettent de sonder les mécanismes bio-adhésifs indépendamment puis conjointement, par l'identification préalable des déterminants de surface mis en jeu. Il faut également veiller au maintien de conditions aussi proches que possible de l'environnement physiologique. Afin de mieux comprendre ces interrelations, nous allons présenter maintenant l'organisation générale de la paroi des lactocoques et des BL, de manière plus large.

3.2. Composition de la paroi des lactocoques

La paroi bactérienne des lactocoques, comme celle de nombreuses bactéries à Gram positif, est composée de **peptidoglycane (PG), d'acides téichoïques (TA) et lipotéichoïques (LTA), de polysaccharides accessoires (PS) et de protéines (PR)**. Elle peut être schématisée comme représenté sur la Figure 3 (Andre, *et al.*, 2008).

Une des premières études détaillées du peptidoglycane chez les lactocoques a été réalisée par Schleifer et Kandler (Schleifer & Kandler, 1972), chez *Streptococcus lactis* et *S. cremoris* (ancienne dénomination de *L. lactis* ssp. *lactis* et *L. lactis* ssp. *cremoris*). Chimiquement, le peptidoglycane est formé d'une partie glucidique et d'une partie peptidique. Le polysaccharide est un polymère de glycosaminopeptide où la N-acétyl-glucosamine et l'acide N-acétyl-muramique sont liés par des liaisons osidiques β -(1-4). Ces longues chaînes de glycannes sont liées transversalement par des tétra-peptides linéaires attachés aux résidus d'acide N-acétyl-muramique et par un pont inter-peptidique constitué d'un ou plusieurs acides aminés. Il en résulte la formation d'une structure d'épaisseur approximative 50 nm, cohésive et élastique, qui agit comme un exosquelette pour la cellule, lui permettant de supporter des pressions de turgescence de l'ordre de 20 atm. Le réseau cristallin, fourni par le

peptidoglycane, permet la fixation de molécules amorphes, telles que polysaccharides, LTA, protéines, liées ou non de façon covalente, pour finalement former une structure de surface complexe.

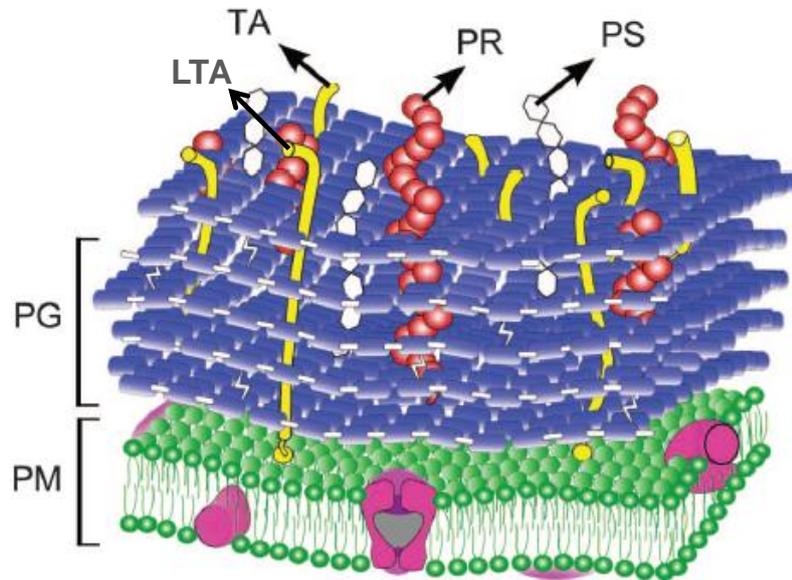


Figure 3. Représentation schématique de la paroi cellulaire de *L. lactis*. TA : acides téichoïques, LTA : acides lipotéichoïques, PR : protéines, PS : polysaccharides, PG : peptidoglycane, PM : membrane plasmique (Andre, *et al.*, 2008).

Les polysaccharides (PS) de la paroi cellulaire des lactocoques sont composés de différents sucres (rhamnose, glucose, galactose et glucosamine) (Johnson & McDonald, 1974 ; Schleifer & Kilpper-Bälz, 1987). Sijtsma *et al.* ont signalé la présence de ces monosaccharides dans la paroi cellulaire de *L. lactis* ssp. *cremoris* pour les souches SK110 et SK112 (Sijtsma, *et al.*, 1991). Les PS sont parfois appelés polysaccharides neutres afin de les distinguer des polysaccharides anioniques constituant les acides téichoïques. En dépit de cette dénomination, certains polysaccharides peuvent être acides, du fait de leur ramification par des substituants anioniques comme la glycérine phosphate (Coyette & Ghuysen, 1970 ; Kojima, *et al.*, 1986). Conceptuellement, une distinction doit être faite entre les polysaccharides capsulaires (CPS) et les polysaccharides de l'enveloppe cellulaire (WPS). Les CPS forment une coque épaisse et structurée, souvent liée de façon covalente à la paroi bactérienne. Les WPS, quant à eux, décoorent l'enveloppe cellulaire et peuvent être soit liés de manière covalente (Coyette & Ghuysen, 1970), soit faiblement associés (Gopal & Crow, 1993) au peptidoglycane. Les polysaccharides extracellulaires (EPS) constituent une catégorie

distincte de polysaccharides qui sont, eux, libérés dans le milieu (Whitfield, 1988). Largement décrits comme des facteurs de virulence chez les bactéries pathogènes, les CPS ne sont pas une caractéristique commune des bactéries alimentaires telles que *L. lactis*. En revanche, certaines souches de *L. lactis* sont connues pour produire des EPS qui revêtent une importance industrielle, car ils contribuent à la texture des produits laitiers fermentés (Jean Delcour, *et al.*, 1999). Les gènes plasmidiques responsables de la production d'EPS dans les souches laitières de *L. lactis* ont été caractérisés, et leur organisation a été jugée similaire à celle des clusters de gènes pour la biosynthèse de CPS chez les pathogènes à Gram positif (van Kranenburg, *et al.*, 1999). La présence de gènes chromosomiques codant pour des CPS a néanmoins été suggérée pour certaines souches de lactocoques (Dabour & LaPointe, 2005). Dans une étude récente (Chapot-Chartier, *et al.*, 2010), les auteurs ont identifié un type de CPS produit par *L. lactis* et qui forme une pellicule compacte située à la surface cellulaire. La capacité potentielle de cette pellicule d'interférer avec le système immunitaire et/ou de constituer une barrière pour la délivrance de protéines extracellulaires suggère une réelle importance qu'il s'agit désormais de mieux caractériser.

Les acides lipotéichoïques de la paroi cellulaire des lactocoques (Forsén, *et al.*, 1985 ; Sijtsma, *et al.*, 1990) et, de manière plus générale, chez les bactéries à Gram positif (Wicken & Knox, 1975) se composent typiquement d'un polymère linéaire de 16 à 40 résidus de glycéro-phosphate, liés de manière covalente à une fraction lipidique de la membrane. Les LTA confèrent à la cellule plusieurs de ses propriétés de surface, notamment l'hydrophobie (Miorner, *et al.*, 1983) et la charge (Mozes, *et al.*, 1988). L'impossibilité d'obtenir des mutants stables de bactéries à Gram positif ayant un métabolisme défectueux pour les LTA est une preuve supplémentaire de l'importance physiologique de ces molécules (Sutcliffe & Shaw, 1991). Selon Miorner *et al.* (Miorner, *et al.*, 1983), les LTA contribuent de manière significative aux propriétés adhésives de la bactérie, du fait de leur rôle dans l'hydrophobie de surface (Rosenberg. M & Kjelleberg. S, 1986).

Les protéines, présentes en surface en quantités importantes chez les bactéries à Gram positif (Archibald, *et al.*, 1993), peuvent exercer plusieurs fonctions, comme l'adhésion aux surfaces abiotiques et biotiques (tissus de l'hôte), la liaison à des composants spécifiques du système immunitaire, l'hydrolyse des protéines, l'absorption de nutriments, ou l'agrégation inter-bactérienne pour le transfert d'ADN. Les protéines sont soit liées de façon covalente, soit maintenues en place par d'autres interactions (liaisons hydrogène, interactions hydrophobes). Les protéinases de la paroi des lactocoques (Pritchard & Coolbear, 1993) sont

attachées à la membrane plasmique par une longue chaîne de polypeptide qui permet de traverser l'ensemble du réseau de PG. De cette façon, la partie active de l'enzyme est exposée vers le milieu extérieur. Les protéines liées de façon covalente à la paroi cellulaire partagent le consensus LPxTG (Navarre & Schneewind, 1999) dans leur séquence C-terminale ; on les appelle les protéines ancrées à la paroi cellulaire. Au contraire, les protéines, liées de façon non covalente à la paroi (comme les autolysines), peuvent être extraites par des agents chaotropiques tels que le chlorure de lithium (Hancock & Poxton, 1988). En ce qui concerne *L. lactis*, trois protéines de surface ont été attribuées à un même groupe de protéines ancrées à la paroi cellulaire (Navarre & Schneewind, 1999) : la protéine CluA (facteur sexuel), la protéinase plasmidique NisP et la sérine protéase cellulaire plasmidique PrtP. Cette dernière, qui catalyse la dégradation protéolytique des caséines du lait (Siezen, 1999), exerce également une influence prépondérante dans les premières étapes de la formation des biofilms. En effet, PrtP est responsable d'une augmentation de l'hydrophobie de la surface bactérienne et joue donc un rôle positif dans l'adhésion aux surfaces abiotiques (verre, PTFE) chez les lactocoques (Habimana, *et al.*, 2007).

Nous allons maintenant détailler le rôle de ces différents déterminants de surface (protéines, acides téichoïques et lipotéichoïques, EPS...) dans l'adhésion à la muqueuse intestinale, en élargissant à d'autres BL que les lactocoques (lactobacilles essentiellement).

3.3. Rôle des déterminants de surface des BL dans l'adhésion à la muqueuse intestinale

3.3.1. Protéines de surface

Les protéines de surface, impliquées dans l'adhésion à la muqueuse et le plus souvent étudiées chez les lactobacilles, sont des protéines de la couche S, des protéines à domaines MUB (« Mucus Binding ») et d'autres protéines à fonction particulière.

En complément des protéines de surface décrites précédemment pour les lactocoques, l'enveloppe des BL peut comprendre une (ou deux) couche(s) (couche S ou « S-layer »), formée(s) par des sous-unités protéiques, parfois glycosylées, et organisée(s) selon une géométrie hexagonale ou quadratique paracristalline (Hilgendorf, *et al.*, 2000). A noter que ce type de structure est retrouvé exclusivement chez le genre *Lactobacillus* (von Kleist, *et al.*, 1975 ; Pinto, *et al.*, 1983). Bien que la fonction biologique de la plupart des protéines de la

couche S ne soit pas encore clairement élucidée, plusieurs d'entre elles ont été identifiées comme responsables de l'adhésion des BL aux cellules épithéliales intestinales et à la matrice extracellulaire, chez *L. acidophilus* NCFM (Buck, *et al.*, 2005), *L. acidophilus* M92 (Kos, *et al.*, 2003), *L. brevis* ATCC 8287 (Leeuw, *et al.*, 2006), *L. crispatus* JCM 5810 (Sillanpaa, *et al.*, 2000) et *L. helveticus* R0052 (Johnson-Henry, *et al.*, 2007). Toutefois, il faut noter que ces études sont basées sur l'utilisation de différents agents chimiques (chlorure de lithium, chlorure de guanidine) pour extraire ou éliminer les protéines de la couche S. Il n'est alors pas exclu que d'autres protéines n'aient été affectées par un tel traitement.

Chez les BL (Jean Delcour, *et al.*, 1999), comme mentionné précédemment, certaines protéines de surface contiennent des motifs d'ancrage C-terminal (LPxTG) qui sont reconnus par la sortase (SrtA) et permettent leur fixation covalente à la paroi bactérienne. La majorité de ces protéines n'a pas de fonction réellement identifiée. Toutefois, certaines affichent des domaines conservés, directement impliqués dans la reconnaissance du mucus : les domaines MUB. Constitués de 100 à 200 acides aminés selon les cas, ces domaines se retrouvent généralement en multi-copie dans la protéine. Une étude réalisée *in silico* par Boekhorst *et al.* (2006) a montré que ces domaines étaient majoritairement, sinon quasi-exclusivement, rencontrés dans les BL (lactobacilles, lactocoques, pédiocoques) (Figure 4). Malgré l'intérêt croissant que suscitent ces protéines, du fait de leur rôle potentiel dans l'adhésion aux muqueuses et la colonisation de l'épithélium intestinal, peu d'études se sont tournées vers la validation expérimentale de la fonction des domaines MUB et leurs interactions avec les mucines restent notamment mal caractérisées (Roos & Jonsson, 2002 ; Bumbaca, *et al.*, 2007).

D'autres protéines de surface, soit extraites par voie expérimentale soit prédites à partir des données de séquençage, ont été décrites comme impliquées dans l'adhésion aux cellules épithéliales, au mucus intestinal ou aux composants de la matrice extracellulaire. Par exemple, chez *L. reuteri* 104R, une protéine capable d'adhérer aux cellules Caco-2 (Miyoshi, *et al.*, 2006) présente une forte similarité de séquence avec la protéine de liaison au collagène de *L. reuteri* NCBI11951 (Heinemann, *et al.*, 2000), mais pas avec les protéines à domaines MUB. De manière analogue, un autre type de protéine, permettant l'adhésion à la matrice extracellulaire *via* un domaine liant la fibronectine, a été identifié chez *L. acidophilus* NCFM (Buck, *et al.*, 2005). D'autres protéines adhésives ont également été décrites chez *L. johnsonii* NCC 533 (Granato, *et al.*, 2004) ou encore *L. plantarum* WHE 92 (Izquierdo, *et al.*, 2009), avec seulement un domaine similaire aux facteurs d'élongation retrouvé. Chez *L. johnsonii*

NCC 533, la protéine chaperone GroEL semble agir comme facteur d'adhésion aux cellules épithéliales intestinales humaines et, plus particulièrement, aux cellules à mucus (Bergonzelli, *et al.*, 2006).

Dans une étude récente, l'une des sous-unités protéiques constituant les pili (nommée SpaC) a été décrite chez *L. rhamnosus* GG, avec une implication dans l'adhésion au mucus intestinal chez l'Homme (Kankainen, *et al.*, 2009). Ce mécanisme est d'ailleurs présent chez de nombreuses bactéries pathogènes à Gram positif (*Corynebacterium diphtheriae*, *Streptococcus agalactiae*, *Actinomyces naeslundii*...) (Mandlik, *et al.*, 2008). De manière plus large, les sous-unités constitutives des pili (SpaCBA et SpaFED) ont été étudiées pour élucider leur rôle respectif dans les processus bio-adhésifs. Seulement trois sous-unités pilines, SpaB, SpaC et SpaF, présentent un degré important de liaison au mucus (von Ossowski, *et al.*, 2010). De plus, seule la piline mineure SpaB est chargée positivement, et de ce fait, l'interaction avec les groupements chargés négativement de la muqueuse est de type électrostatique et ne serait pas liée à un domaine spécifique du type « mucus-binding ».

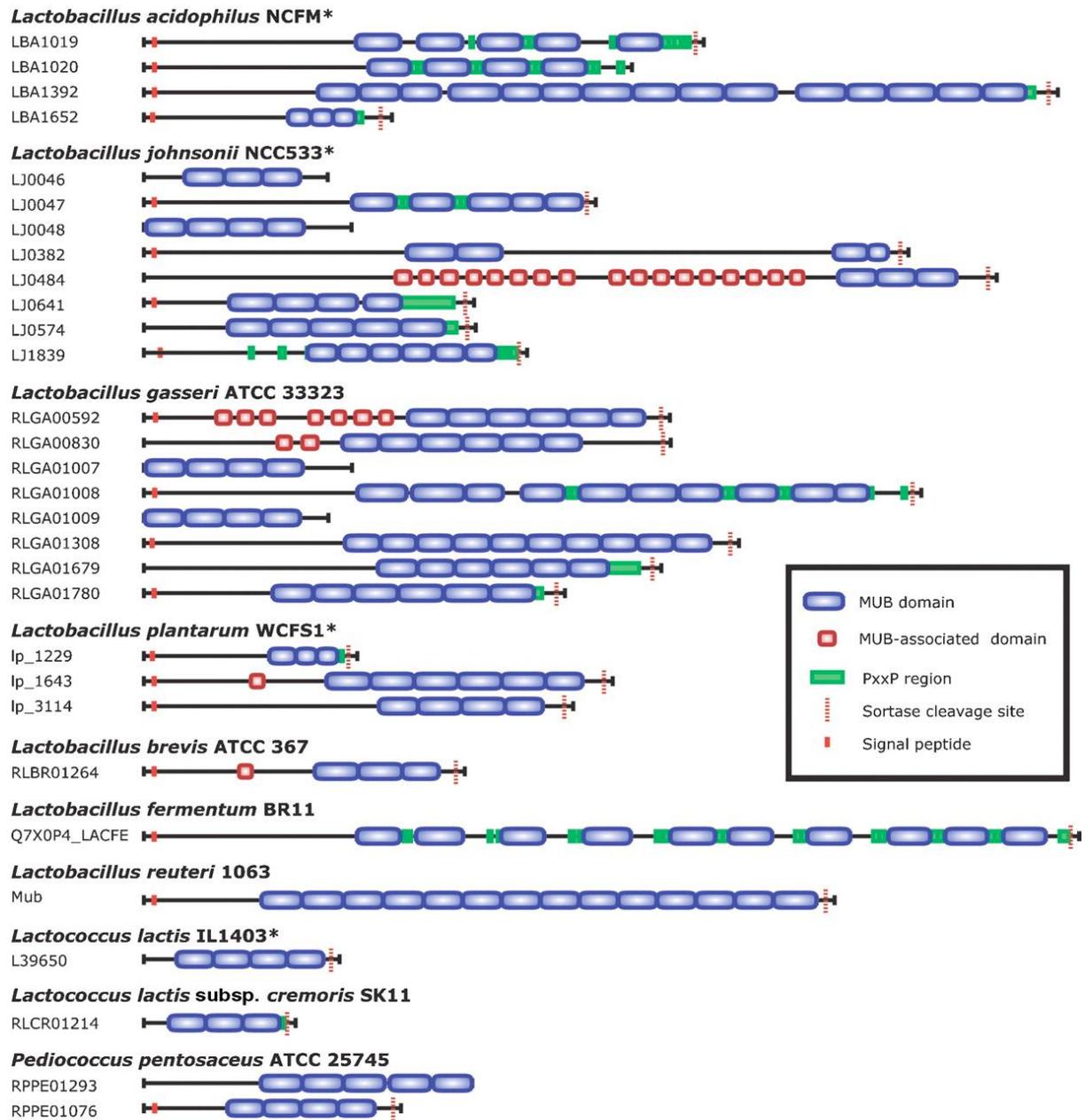


Figure 4. Architecture des protéines contenant des domaines MUB chez certaines BL (Boekhorst, *et al.*, 2006).

3.3.1. Autres déterminants de surface

D'autres composés non protéiques jouent *a priori* un rôle dans l'adhésion des BL à la muqueuse intestinale. Les acides téichoïques (TA) ou lipotéichoïques (LTA), impliqués dans la charge de surface négative, seraient capables de promouvoir l'adhésion à des cellules intestinales humaines (lignée cellulaire Caco-2) de *L. johnsonii* (Granato, *et al.*, 1999) ou *L. reuteri* (Walter, *et al.*, 2007). Chez *L. reuteri* 100-23, un mutant *dltA*, déficient dans les résidus D-Ala terminaux des LTA, possède une capacité réduite de colonisation du tube digestif et de formation de biofilms *in vivo*, notamment au niveau stomacal, pour un modèle murin (Walter, *et al.*, 2007). Toutefois, lorsque l'adhésion des souches sauvage et mutante a été étudiée sur des tissus d'estomac *ex vivo*, aucune différence significative n'a été observée, ce qui semble indiquer que les esters D-alanyl des LTA ne contribuent pas à la phase d'adhésion initiale de *L. reuteri*. Ces résultats mettent également en évidence les difficultés de transposition d'échelle (*in vivo*, *ex vivo*, *in vitro*).

Comme les LTA, **les exopolysaccharides (EPS) jouent généralement un rôle important dans les interactions non spécifiques des lactobacilles avec les surfaces, notamment biotiques.** Il a été également démontré que les EPS exercent un effet indirect sur l'adhésion en « recouvrant » les autres adhésines de la surface cellulaire. Par exemple, chez *L. johnsonii* NCC533, la suppression de l'ensemble du cluster codant pour les EPS prolonge légèrement la persistance du mutant dans l'intestin par rapport à la souche contrôle (Denou, *et al.*, 2008). Chez *L. acidophilus* CRL639, les EPS seraient un inhibiteur de l'adhésion à la matrice extracellulaire (Lorca, *et al.*, 2002). Ruas-Madiedo *et al.* (Ruas-Madiedo, *et al.*, 2006) observent des effets à la fois bénéfiques et délétères des EPS sur l'adhésion des probiotiques et des entéropathogènes à la muqueuse intestinale chez l'Homme. Les mécanismes non spécifiques semblent prédominer mais il n'est pas exclu que les EPS puissent agir comme des ligands (lectines de l'hôte ou des pathogènes) et promouvoir alors l'adhésion spécifique et la co-agrégation, selon des mécanismes restant à décrypter (Ruas-Madiedo, *et al.*, 2006).

3.3.2. Mécanismes d'adhésion et déterminants de surface chez *L. lactis*

Les études réalisées jusqu'à présent sur l'adhésion de *L. lactis* aux surfaces abiotiques (verre, polymères) ont permis d'identifier, du moins pour partie, certains déterminants moléculaires impliqués dans les processus bio-adhésifs, comme vu précédemment pour la protéine de surface PrtP (Habimana, *et al.*, 2007). Il a, par ailleurs, été montré que la surface hydrophile de *L. lactis* LMG9452 est principalement due à une concentration de polysaccharides environ deux fois supérieure à celle des protéines (Boonaert & Rouxhet, 2000). En effet, l'hydrophobie de la surface cellulaire est généralement corrélée à la concentration en azote (caractéristique des protéines) ou en carbone, et inversement corrélée à la concentration en oxygène (Dufrêne, *et al.*, 1997 ; Boonaert & Rouxhet, 2000). Giaouris *et al.* (Giaouris, *et al.*, 2008) ont, eux, étudié la relation entre le degré de D-alanylation des acides téichoïques (TA) chez *L. lactis* (souche MG1363) et la résistance aux antimicrobiens cationiques (nisine, lysozyme) ainsi que l'adhésion aux surfaces abiotiques. Une augmentation du degré de D-alanylation des TA entraîne une meilleure résistance bactérienne vis-à-vis de la nisine et du lysozyme. Il a également été vérifié que l'absence de D-alanylation conduit à une résistance moindre envers les mêmes composés. En revanche, ces mêmes variations du degré de D-alanylation ne modifient ni la charge ni l'hydrophobie de la surface cellulaire. De ce fait, l'adhésion de *L. lactis* au verre et au polystyrène reste inchangée. Les auteurs concluent que, chez *L. lactis*, les substituants D-alanyl des acides téichoïques sont situés à l'intérieur de la paroi cellulaire plutôt qu'exposés en extrême surface.

Pour illustrer la biodiversité récemment décrite chez les lactocoques (Passerini, *et al.*, 2010), nous pouvons citer l'étude réalisée par Giaouris *et al.* (Giaouris, *et al.*, 2009) sur les propriétés physico-chimiques d'une collection de 50 souches de *L. lactis* d'origine différente (souches laitières et environnementales) et les conséquences en termes d'adhésion au polystyrène. Une analyse de multi-variance globale des résultats (tests MATS-Microbial adhesion to solvents et zétamétrie) a révélé une forte diversité des propriétés de surface. 52 % des souches présentent une surface hydrophile et électronégative, comme généralement décrit. Toutefois, un groupe de souches (12 %) apparaît très hydrophobe, alors qu'un autre (18 %) se caractérise par une faible charge de surface. Rappelons que trois types de groupements ionisés sont impliqués dans les propriétés électriques de surface chez *L. lactis* : (i) les groupements phosphate ($pK_a = 2,15$), présents dans les acides téichoïques et lipotéichoïques ; (ii) les groupements carboxylate ($pK_a = 3,95$) et les groupements amines protonées des protéines ($pK_a = 9,67$) (Boonaert & Rouxhet, 2000).

Sur la base de cette classification selon les propriétés de surface (hydrophobie/hydrophilie, électronégativité), les auteurs ont ensuite étudié l'adhésion au polystyrène de douze souches représentatives de chacun des trois groupes (Giaouris, *et al.*, 2009). Une corrélation significative entre l'adhésion bactérienne, l'hydrophobie et la faible électronégativité a été observée pour un milieu à faible force ionique. Pour les souches les plus chargées négativement et hydrophiles, la présence d'interactions électrostatiques répulsives avec la surface réceptrice conduit à une diminution de l'adhésion.

Chez *L. lactis*, les travaux de la littérature sur l'adhésion aux surfaces biotiques sont peu nombreux. Certaines études soulignent toutefois un pouvoir d'adhésion élevé à la muqueuse intestinale par rapport à d'autres BL comme *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. acidophilus* (Kimoto, *et al.*, 1999 ; Ouwehand, *et al.*, 1999 ; Ouwehand, *et al.*, 2000), même si les approches mises en œuvre restent trop descriptives pour être réellement convaincantes.

Au niveau des connaissances sur les déterminants de surface impliqués, là-encore les données sont parcellaires. A la différence des lactobacilles qui contiennent pour la plupart de nombreuses protéines portant des domaines MUB, les lactocoques, figurant dans l'étude de Boekhorst *et al.* (2006) et dont le génome est séquencé, *L. lactis* IL1403 et *L. lactis* ssp. *cremoris* SK11, ne comportent qu'une seule protéine affichant ce domaine : L39650 et RLCR01214, respectivement (Figure 5). L39650 et RLCR01214 sont des protéines de petite taille (<1000 aa), comparativement aux autres protéines du même type, et sont essentiellement constituées de domaines MUB ; elles en contiennent quatre et trois, respectivement. A noter l'absence de peptide signal (Figure 5).

Par ailleurs, Dieye *et al.* (Dieye, *et al.*, 2010) ont identifié et étudié la sortase A chez *L. lactis* IL1403. Il existe *a priori* une relation entre l'activité sortase et l'adhésion aux cellules épithéliales humaines chez *L. salivarius*, bien que l'implication directe de la sortase n'ait pas été clairement établie (van Pijkeren, *et al.*, 2006). Récemment, l'activité sortase a pu être corrélée à l'assemblage des pili et aux propriétés adhésives de *L. rhamnosus* GG (Kankainen, *et al.*, 2009), comme indiqué précédemment. Chez *L. lactis* IL1403, les auteurs ont démontré que la sortase A est responsable de l'ancrage à la paroi cellulaire d'au moins cinq protéines contenant le motif LPxTG. En plus de SrtA, les auteurs ont identifié par analyse *in silico* une sortase C putative chez *L. lactis*, jusqu'alors exclusivement retrouvée chez certaines bactéries pathogènes à Gram positif et impliquée dans la formation des pili (Mandlik, *et al.*, 2008). Le rôle possible chez *L. lactis* de SrtC dans la formation des pili et les propriétés muco-adhésives sera évoqué dans la partie *Résultats* (chapitre 2.3).

3.4. Modèles d'adhésion à la muqueuse intestinale

Avant d'aborder la présentation des différents modèles d'adhésion mis en œuvre expérimentalement, rappelons que la muqueuse intestinale est structurée selon le schéma présenté dans la Figure 5. Nous pouvons observer l'agencement successif des différentes couches (notamment le mucus), de la lumière jusqu'à la muqueuse puis la sous-muqueuse.

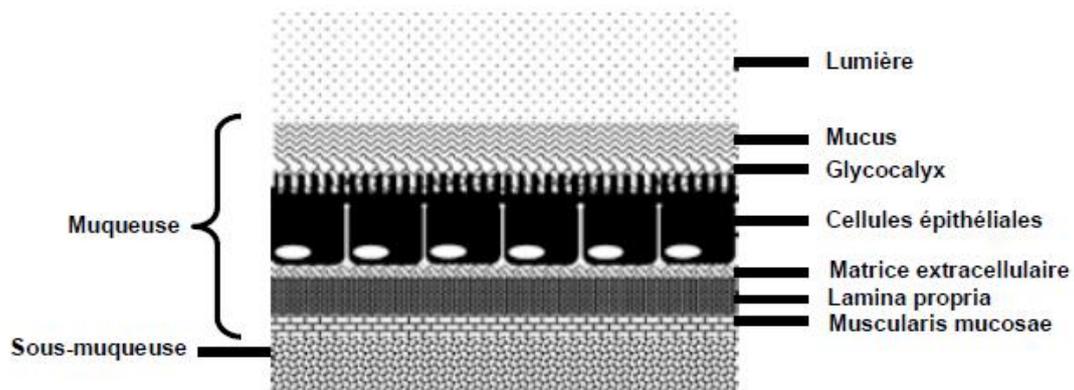


Figure 5. Représentation schématique des constituants de la muqueuse intestinale humaine (Vélez, *et al.*, 2007).

Afin d'étudier les processus multifactoriels de l'adhésion, une grande variété de modèles *in vitro* a été développée pour des expériences de routine (criblage de souches probiotiques, exclusion de pathogènes), par exemple l'étude sur des cellules dérivées Caco-2 ou HT29 chez l'Homme (von Kleist, *et al.*, 1975 ; Pinto, *et al.*, 1983). Les cellules Caco-2 présentent de nombreuses propriétés similaires aux cellules de l'intestin grêle *in vivo* ; elles forment une monocouche polarisée de cellules différenciées présentant une bordure en brosse (Hilgendorf, *et al.*, 2000). Les cellules HT29 sont des cellules épithéliales intestinales humaines indifférenciées (Rousset, 1986). Même si ces deux modèles de cellules sont couramment utilisés pour les études d'adhésion *in vitro*, aucun n'intègre la présence de mucus. Après traitement par le méthotrexate (MTX), les cellules HT29 se différencient en cellules caliciformes qui produisent du mucus (Lesuffleur, *et al.*, 1990). Toutefois, les mucines produites sont des mucines gastriques (MUC3 et MUC5C) et non intestinales. Des modèles de mucus intestinal immobilisé (Roos & Jonsson, 2002 ; Vesterlund, *et al.*, 2005) et de matrices extracellulaires immobilisées (Lindgren, *et al.*, 1992) ont également été mis au point.

Une alternative consiste à utiliser des mucines, commerciales ou purifiées, qui sont alors simplement adsorbées sur les parois d'une microplaque en polystyrène, le pourcentage

d'affinité des bactéries étant déterminé après incubation en conditions statiques. La mucine gastrique de porc (PGM) est, dans ce cas, un modèle largement exploité pour évaluer l'adhésion de BL (Iñiguez-Palomares, *et al.*, 2011) ou de bactéries pathogènes (Nordman, *et al.*, 1999). Toutefois, ces approches restent qualitatives ou semi-quantitatives et les résultats correspondants peuvent être largement biaisés (désorption des protéines à l'étape de lavage, décrochage des bactéries par l'interface eau/air créée lors du dénombrement).

Face à ce constat, il est impératif d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes de muco-adhésion chez *L. lactis*. Dans ce contexte, il s'agit de développer des outils et des méthodes permettant de sonder les interactions aux échelles pertinentes, dans l'environnement adéquat (physico-chimique, hydrodynamique), tout en mettant à profit la biodiversité naturelle observée chez les lactocoques (Passerini, *et al.*, 2010). La finalité de ces travaux s'inscrit dans des applications alimentaires (aliments fonctionnels, probiotiques) et/ou médicales (vaccins (Mannam, *et al.*, 2004), système de délivrance de molécules thérapeutiques (Steidler & Rottiers, 2006)). La prochaine partie s'attache à décrire les méthodes utilisées *in vitro* pour sonder l'adhésion bactérienne à des échelles complémentaires (de la cellule unique jusqu'à l'ensemble de la population), en conditions statiques ou dynamiques.

4. Outils et méthodes *in vitro* pour quantifier l'adhésion bactérienne : vers le couplage d'échelles

Peu de travaux sont consacrés à l'étude de la dynamique de l'adhésion ou de la colonisation du tractus gastro-intestinal (GIT) par les BL, en particulier les lactobacilles, *in vivo* dans des modèles animaux (Walter, *et al.*, 2007 ; Walter, *et al.*, 2008) ou chez l'Homme (Valeur, *et al.*, 2004). En effet, les bactéries exogènes sont, en général, seulement capables de coloniser le GIT de manière temporaire. Ce phénomène serait lié à la résistance du GIT à la colonisation, selon le principe d'exclusion de niche, où chaque niche dans le GIT est colonisée par des espèces bien adaptées (Walter, J, 2005). Le microbiote intestinal chez un individu sain est tout à fait stable et semble montrer une certaine résistance à la colonisation par de nouvelles espèces. Ainsi, Tannock *et al.* (Tannock, *et al.*, 2000) ont montré que la capacité d'implantation de *L. rhamnosus* DR20 vis-à-vis du microbiote intestinal humain est inversement corrélée à la présence d'une population endogène stable de lactobacilles. Les difficultés rencontrées dans l'étude de l'adhésion bactérienne *in vivo*, en particulier chez l'Homme, ont conduit à l'élaboration de modèles *in vitro* pour le criblage de souches probiotiques potentiellement adhésives (Sarem-Damerdj, *et al.*, 1995 ; Ouwehand, *et al.*, 1999), comme présenté dans la partie I-3.4. Dans une étude récente (Sugimura, *et al.*, 2011), les auteurs ont démontré la relation directe entre l'adhésion *in vitro* à la muqueuse et la capacité de colonisation *in vivo* des BL. Les bactéries, présentant une faible adhésion *in vitro*, disparaissent rapidement de l'écosystème intestinal après arrêt de l'administration, tandis que les bactéries, dotées de fortes capacités bio-adhésives *in vitro*, colonisent le GIT pendant une durée minimale de trois semaines.

Nous avons soulevé dans le paragraphe I-3.3 les limites des techniques traditionnellement mises en œuvre pour quantifier l'adhésion bactérienne à la muqueuse intestinale, d'un point de vue mécanistique. Pour lever ces limites, d'autres outils, développés jusqu'alors principalement sur les surfaces abiotiques, peuvent être envisagés. Nous allons les détailler en présentant, pour chacun, le principe, la mise en œuvre et quelques exemples d'application sur les BL mais également sur d'autres types de microorganismes. Il faut noter que leur combinaison permet de sonder le processus bio-adhésif non seulement à l'échelle de la population bactérienne mais également à l'échelle de la cellule unique, à la fois en conditions statiques et dynamiques.

4.1. Microscopie à force atomique (AFM)

Parmi les techniques récentes pour la quantification directe des interactions bactériennes avec les surfaces, la microscopie à force atomique (AFM pour « Atomic Force Microscopy ») a, depuis son invention en 1986 (Binnig, *et al.*, 1986), prouvé sa pertinence en biologie. Les premiers instruments AFM sont dédiés à l'imagerie de surface de matériaux non conducteurs à une haute résolution latérale et verticale sous vide. La technique a ensuite été adaptée à divers environnements (liquide ou air, température ambiante ou basse température et/ou en présence de champs magnétiques) pour des applications en chimie ou en biologie. L'AFM permet d'obtenir, en milieu liquide sur des échantillons vivants, une résolution sans précédent (de l'ordre du nm). La surface de l'échantillon est balayée par une pointe dont la déflexion permet de reconstituer une image 3D de la surface (Figure 6).

Aujourd'hui, des milliers d'appareillages AFM sont utilisés dans le monde et la part consacrée aux études biologiques ou médicales augmente de manière régulière. L'avantage de cette technique repose sur la possibilité de manipuler en milieu aqueux une grande variété d'échantillons biologiques - des molécules uniques, comme les acides nucléiques ou les protéines, aux assemblages macromoléculaires ou aux cellules entières – comme évoqué par Parot *et al.* (Parot, *et al.*, 2007). De plus, l'AFM peut être utilisée en mode spectroscopie de force, qui offre un large éventail de stratégies pour étudier les mécanismes mis en jeu dans l'adhésion bactérienne à la matrice extracellulaire, à d'autres bactéries ou aux biomatériaux, dans leur environnement natif.

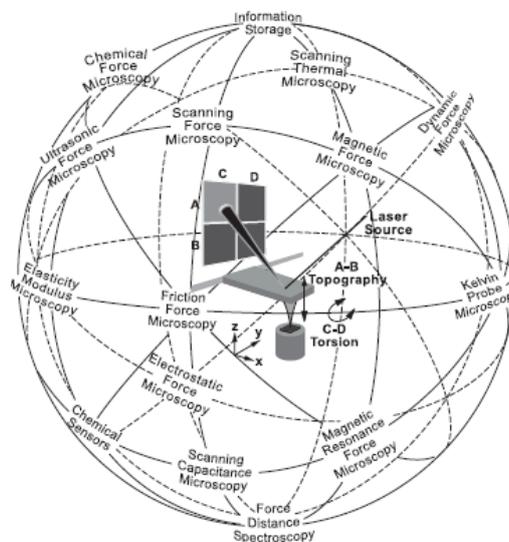


Figure 6. Principe et applications de l'AFM (Lang, *et al.*, 2002).

4.1.1. Principe : imagerie et spectroscopie de force

L'imagerie par AFM est effectuée non pas par un faisceau incident de photons ou d'électrons comme dans d'autres microscopies, mais par détection de la force entre une sonde pointue et la surface de l'échantillon (Dufrêne, 2002) (comme illustré dans la Figure 6). Une image AFM est enregistrée par mesure des changements de force quand la pointe balaye la surface en x et y. De plus, l'échantillon est monté sur un scanner piézo-électrique, ce qui assure son positionnement en trois dimensions avec une résolution élevée. La force est contrôlée par la fixation de la pointe à un levier pliable (ou « cantilever »), qui agit comme un ressort, et l'on mesure la déflexion ou « déviation » du levier. Ainsi, plus le levier dévie, plus la force détectée est élevée. La plupart des instruments utilisent aujourd'hui une méthode optique afin de mesurer la déformation du levier à haute résolution. Un faisceau laser est focalisé sur l'extrémité libre du levier, et la position du faisceau réfléchi est détectée par une photodiode. Les leviers et les pointes sont généralement fabriqués en silicium ou en nitrure de silicium par des techniques de micro-fabrication.

L'instrument peut être utilisé dans différents modes d'imagerie (Figure 7a, b). En mode contact, la pointe et l'échantillon sont mis en contact et la pointe est tout simplement scannée sur la surface ; on obtient ainsi une image topographique 3D de la surface. Le système de feedback conserve la déflexion du levier (normal à la surface) constante en déplaçant en avant ou en arrière la pointe sur la surface. En mode « tapping », également dénommé mode intermittent, l'oscillation du levier est proche de sa fréquence de résonance (utilisation d'un piézoélectrique). La pointe oscille jusqu'à ce qu'elle touche la surface, ce qui réduit l'amplitude de l'oscillation. Cette réduction devient alors le feedback de contrôle, qui peut être utilisé pour mesurer la topographie de la surface. En raison de son contact intermittent avec l'échantillon, le mode « tapping » peut réduire significativement les forces latérales au cours de l'acquisition de l'image, ce qui est un réel avantage pour l'imagerie d'échantillons biologiques et souples (pas de décrochement de l'échantillon au passage de la pointe). Enfin, l'AFM peut également être exploitée en mode non-contact. Ici, la pointe oscille à une certaine distance de la surface, zone où les forces attractives ou répulsives dominant.

Bien que l'AFM ait été initialement introduite comme une technique d'imagerie à haute résolution, elle est également très utile pour mesurer les forces d'interaction, grâce au mode appelé spectroscopie de force (Heinz & Hoh, 1999). Ici, la déflexion du levier est enregistrée en fonction du déplacement vertical du scanner piézo-électrique, c'est-à-dire que l'échantillon est approché en direction de la pointe puis éloigné. En utilisant la pente de la courbe de force

de rétraction dans la région où la pointe et l'échantillon sont en contact, la tension de la photodiode peut être convertie en une déviation de levier (d), puis en une force (F) en utilisant la loi de Hooke : $F = -k.d$, où k est la constante de raideur du levier. La distance de « séparation-zéro » correspond au point de contact entre la pointe et l'échantillon, c'est-à-dire le début de la partie verticale linéaire. Dans le cas d'une surface rigide, la sensibilité du photodétecteur et le point de contact sont faciles à définir à partir des courbes brutes.

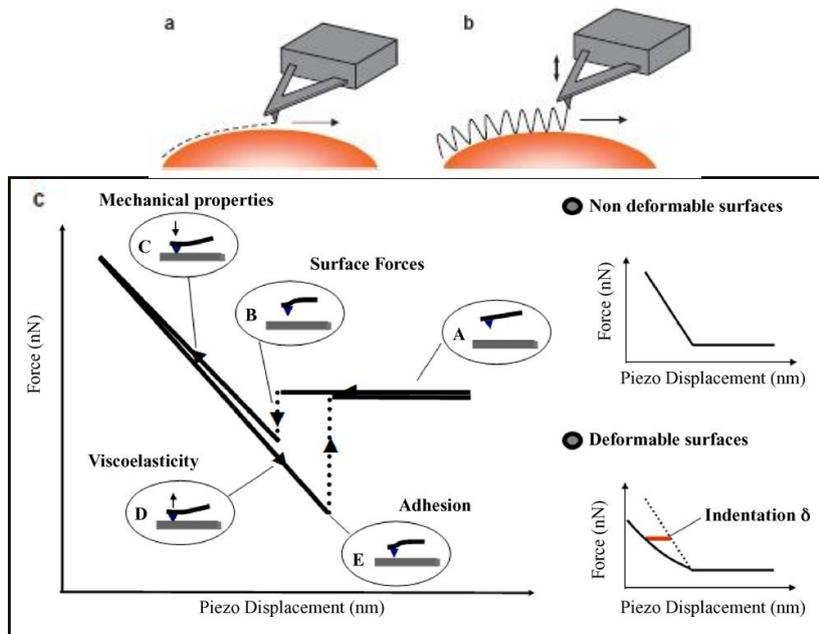


Figure 7. Les différents modes d'imagerie AFM : (a) mode contact ; (b) mode « tapping » (Dufrêne, 2008) ; (c) exemple de courbe typique force-distance avec une force attractive entre la pointe AFM et l'échantillon (Gaboriaud & Dufrêne, 2007).

Les courbes de force en fonction du déplacement, illustrées sur la Figure 7c, fournissent des renseignements sur les propriétés mécaniques, les forces de surface, l'énergie d'adhésion et la viscoélasticité, résultant de l'interaction entre la pointe et la surface. Lorsque la pointe est descendue vers la surface de l'échantillon (A), une déformation négative du levier (levier pliant vers le bas) est produite en raison de l'interaction attractive de van der Waals (B). Quand le contact entre la pointe et l'échantillon se produit, une déformation du levier est observée (C), ce qui peut fournir des informations directes sur les propriétés nanomécaniques de l'échantillon (rigidité de la paroi bactérienne, par exemple). Lorsque la pointe est retirée de

l'échantillon (D), la courbe montre souvent une hystérésis¹ en fonction de la force d'adhésion, qui dépend de la surface, du temps de contact, et de l'énergie de surface entre la pointe et l'échantillon (E). Les courbes de force peuvent être enregistrées, soit à un emplacement bien défini (x, y), soit à plusieurs endroits afin d'obtenir une image « force-volume » (Heinz & Hoh, 1999). On peut ainsi obtenir une cartographie spatiale des propriétés de l'échantillon et des forces d'interactions moléculaires.

4.1.2. Applications

En complément de sa capacité d'imagerie à haute résolution, l'AFM en mode de spectroscopie de force permet de mesurer à l'échelle locale les propriétés mécaniques de la surface bactérienne. Les mesures d'élasticité consistent à enregistrer les courbes force-distance classiques sur les bactéries et à les convertir en courbes force-indentation à l'aide de traitements appropriés. Les résultats peuvent alors être analysés à l'aide de modèles théoriques pour fournir des informations quantitatives sur l'élasticité de la surface de l'échantillon (calcul du module de Young notamment). Dans leur étude pionnière, Xu et al. (Xu, *et al.*, 1996) ont mesuré le module d'élasticité de la gaine de *Methanospirillum hungatei* GP1. Les valeurs importantes du module de Young (2×10^{10} à 4×10^{10} N/m²) indiquent que la paroi de ce microorganisme peut résister à une pression interne de 300-400 atm. Ce type d'analyse a ensuite été étendu à d'autres types de microorganisme (Velegol & Logan, 2002).

Par ailleurs, plusieurs études ont montré que l'AFM utilisant des pointes fonctionnalisées peut sonder les interactions moléculaires et les propriétés physico-chimiques (Ahimou, *et al.*, 2002 ; Dupres, *et al.*, 2005 ; Dague, *et al.*, 2007). La charge et l'hydrophobicité de surface jouent des rôles essentiels dans les interactions cellulaires. La modification de la pointe d'AFM avec des groupements chimiques spécifiques permet aux chercheurs de cartographier les variations locales de ces propriétés à l'échelle des cellules individuelles. Par exemple, des pointes AFM modifiées avec des groupements carboxyle ont été utilisées pour sonder le point isoélectrique de *S. cerevisiae* (Ahimou, *et al.*, 2002). Dans d'autres recherches, des pointes hydrophiles et hydrophobes (modifiées avec les groupements hydroxyle et méthyle, respectivement) ont été utilisées pour sonder le caractère hydrophobe

¹ Soit une grandeur *cause* notée C produisant une grandeur *effet* notée E. On dit qu'il y a hystérésis lorsque la courbe $E = f(C)$ obtenue lors de l'augmentation de C ne se superpose pas avec la courbe $E = f(C)$ obtenue lors de la diminution de C.

de deux microorganismes d'importance médicale, *Aspergillus fumigatus* et *Mycobacterium bovis* (Alsteens, *et al.*, 2007 ; Dague, *et al.*, 2007 ; Dague, *et al.*, 2008).

De façon complémentaire, les pointes AFM peuvent être fonctionnalisées avec des biomolécules cibles afin de mesurer les interactions de type récepteur-ligand à la surface des cellules, à l'échelle de la molécule unique ; on notera par exemple les interactions avidine-streptavidine (Florin, *et al.*, 1994 ; Lee, *et al.*, 2002), anticorps-antigène (Hinterdorfer, *et al.*, 1996), entre brins d'ADN (Lee, *et al.*, 1994), lectine-sucre (Grandbois, *et al.*, 1999), trans-interaction de dimères de cadhérines (Baumgartner, *et al.*, 2000), antigène fonctionnel leucocytaire-1 avec son ligand analogue, une molécule d'adhésion intercellulaire-1 (Zhang, *et al.*, 2002), ou encore sialyl Lewis X-sélectine (Xiaohui, *et al.*, 2004). Une **dernière approche consiste à attacher les cellules ou bactéries directement sur la pointe AFM pour créer une « cell-probe »**. Toutefois, il est essentiel d'éviter la dégradation de la surface cellulaire au cours de la préparation de l'échantillon. Benoit *et al.* (Benoit, *et al.*, 2000) ont développé une méthode élégante dans laquelle les cellules de *Dictyostelium discoideum* sont attachées au levier par des interactions spécifiques. Cela a permis d'évaluer la force d'adhésion entre deux cellules à 23 pN. Bowen et ses collaborateurs ont proposé un autre protocole d'immobilisation (colle et micromanipulateur), pouvant s'avérer préjudiciable au maintien de l'intégrité de la paroi et donc à la fiabilité des mesures de force dans le cas de l'adhésion des spores d'*Aspergillus niger* (Bowen, *et al.*, 2000) et de *S. cerevisiae* (Bowen, *et al.*, 2001) au mica recouvert ou non de l'albumine de sérum bovin (BSA). Touhami *et al.* (Touhami, *et al.*, 2006) ont étudié les forces d'adhésion des pili de *P. aeruginosa* au mica. Ici, la « cell-probe » est conçue en couvrant la pointe avec de la poly-L-lysine afin que les bactéries chargées négativement soient attachées par attraction électrostatique. Ils décrivent un mécanisme en deux étapes, avec (i) le « démêlage » des pili (sur environ 1 μm , en fonction de la longueur des pili), puis (ii) la rupture du complexe bactérie-pili (force de rupture de 95 pN).

Les nombreux exemples d'application sur les BL concernent à la fois l'AFM en mode imagerie (Schär-Zammaretti & Ubbink, 2003 ; Chapot-Chartier, *et al.*, 2010) et en mode spectroscopie de force (Andre, *et al.*, 2008 ; Francius, *et al.*, 2008). Ainsi, Schär-Zammaretti et Ubbink (Schär-Zammaretti & Ubbink, 2003) ont imagé la surface de quelques souches de lactobacilles (*L. helveticus*, *L. johnsonii*, *L. crispatus*). Cette morphologie, couplée à la mesure de l'élasticité de la paroi cellulaire, a ensuite été corrélée aux propriétés physico-chimiques globales (charge et hydrophobie), obtenues par d'autres techniques (MATS, zétamétrie) pour élucider le rôle des constituants de surface (nature, conformation, répartition

spatiale...) dans la relation structure-propriétés de la paroi. Chapot-Chartier *et al.* (Chapot-Chartier, *et al.*, 2010) ont utilisé l'AFM chez *L. lactis* (imagerie et mesure de la rugosité de la surface bactérienne) afin de démontrer l'existence en extrême surface d'une couche compacte de polysaccharides, appelée pellicule.

Par ailleurs, Francius *et al.* (Francius, *et al.*, 2008) ont utilisé l'AFM en mode spectroscopie de force à l'échelle de molécule unique pour analyser les caractéristiques de chaînes polysaccharidiques (nature, élongation, distribution spatiale) chez *L. rhamnosus* GG (LGG), à l'aide de pointes fonctionnalisées avec des lectines de *Pseudomonas aeruginosa* PA-I et de concanavaline A (spécificité vis-à-vis du galactose et du mannose/glucose, respectivement). Les auteurs ont ainsi pu identifier deux types de polysaccharides en surface, dotés de propriétés conformationnelles différentes : (i) un polysaccharide riche en mannose (et probablement aussi en glucose) d'extension modérée (longueurs de rupture allant de 20 à 400 nm) et (ii) un polysaccharide riche en galactose, avec des distances d'élongation plus importantes (typiquement dans la gamme 100-1000 nm). Le réseau de peptidoglycane chez *L. lactis* a également été étudié par spectroscopie de force AFM à l'échelle de la molécule unique, notamment pour sonder les interactions spécifiques (force, localisation spatiale) avec le motif protéique LysM, impliqué dans la dégradation de la paroi bactérienne (Andre, *et al.*, 2008). Des motifs LysM de l'autolysine principale AcmA de *L. lactis* sont ainsi fixés à la pointe AFM, tandis que le peptidoglycane est immobilisé de manière covalente sur une surface d'or fonctionnalisée. Les courbes de force enregistrées montrent une distribution bimodale des forces d'adhésion (deux maxima centrés autour de 75 ± 17 pN et de 170 ± 28 pN), ce qui reflète probablement l'existence d'une ou de deux interactions LysM-peptidoglycane. Les pointes fonctionnalisées avec LysM ont ensuite été mises à profit pour cartographier les interactions avec des cellules de *L. lactis*, en veillant à préserver leur état natif (piégeage mécanique dans une membrane poreuse). Le niveau d'adhésion très faible obtenu suggère un effet de « masquage » du peptidoglycane par d'autres constituants de la paroi bactérienne (probablement les acides téichoïques). En accord avec cette hypothèse, le traitement préalable des bactéries avec l'acide trichloracétique (TCA), destiné à éliminer la couche de peptidoglycane, se traduit par des interactions importantes et homogènes avec la pointe fonctionnalisée avec LysM, avec des niveaux de force quasi-équivalents à ceux obtenus sur la surface modèle de peptidoglycane (distribution de forces avec un maximum à 73 ± 23 pN).

4.2. Chambre à écoulement cisailé

Les chambres à écoulement sont utilisées pour étudier l'adhésion et le détachement des microorganismes aux surfaces dans des conditions hydrodynamiques contrôlées, sans que ces derniers ne soient soumis à une quelconque interface eau-air, qui s'avérerait, le cas échéant, préjudiciable. Plusieurs types de dispositifs ont été développés pour sonder le(s) processus d'interaction *in situ* et à l'échelle multicellulaire, permettant ainsi de prendre en compte d'éventuelles hétérogénéités au sein de de la population microbienne (état physiologique, propriétés de surface...). L'écoulement peut être, selon la géométrie de la chambre, radial ou longitudinal (Busscher & van Der Mei, 1995). Les forces exercées sur les cellules sont alors des forces hydrodynamiques de pression et/ou de cisaillement.

Les observations directes, combinées à un traitement ultérieur des images, rendent alors possible soit l'étude de l'organisation des premières couches du biofilm dans les deux dimensions de l'espace (Landa, *et al.*, 1997 ; Tolker-Nielsen & Sternberg, 2005), soit l'étude du détachement des microorganismes adhérents (Landa, *et al.*, 1999 ; Millsap, *et al.*, 2000). De plus, le contrôle strict des conditions hydrodynamiques à l'intérieur de la chambre permet d'accéder à de nombreuses données expérimentales, telles que la contrainte de cisaillement nécessaire au détachement des microorganismes (Guillemot, *et al.*, 2006) et même, sur la base de quelques hypothèses simplificatrices, la force d'adhésion du microorganisme au support solide (Guillemot, *et al.*, 2007). Cette méthode sera appliquée à la quantification de la force d'adhésion *L. lactis*/PGM, en confrontant les résultats à ceux obtenus à l'échelle de la cellule unique par AFM (Parties III-2.2, 2.3). Avant de donner quelques exemples d'application, nous allons présenter l'approche théorique associée.

4.2.1. Considérations théoriques

Efforts exercés sur le microorganisme adhérent par un écoulement cisailé en régime laminaire

Les microorganismes sont déposés sur une surface soumise à un écoulement cisailé, parfaitement contrôlé et qui permet de déterminer la contrainte de cisaillement nécessaire au détachement des particules biologiques. Un bilan de forces permet d'évaluer la force d'adhésion correspondante.

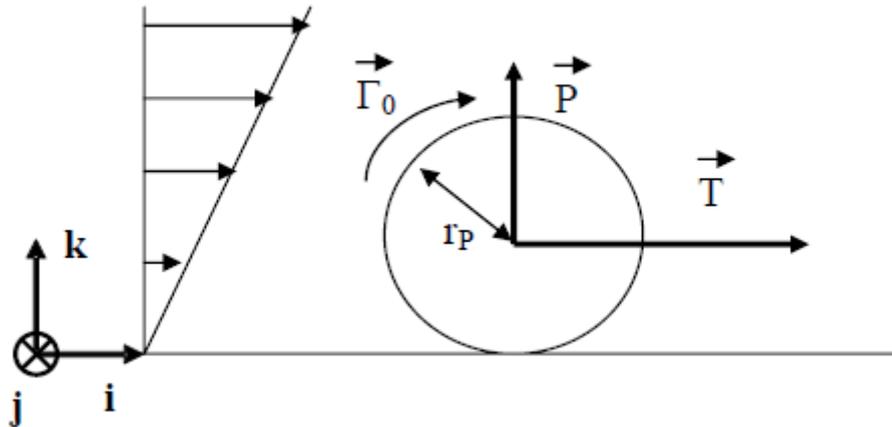


Figure 8. Efforts exercés par un écoulement cisailé sur une particule sphérique (de rayon r_p) en contact avec une surface plane (Guillemot, 2006).

En première approximation, le microorganisme est supposé être parfaitement sphérique et soumis à un ensemble d'efforts qui tendent à le déplacer (Figure 8). La force de traînée, notée \vec{T} , est parallèle à la direction de l'écoulement et liée aux frottements visqueux du fluide sur la surface du microorganisme ; la force de portance \vec{P} est due à la différence de pression de part et d'autre de la particule et est perpendiculaire à la direction de l'écoulement. Le couple hydrodynamique $\vec{\Gamma}_0$ appliqué au centre de la sphère lorsqu'il y a un gradient de vitesse (cisaillement), est perpendiculaire à la direction de la traînée et de la portance. Lorsque l'un de ces efforts dépasse en intensité l'effort dû à l'adhésion, la particule est délogée de la surface. L'intensité des efforts hydrodynamiques dépend de plusieurs facteurs comme la contrainte de cisaillement de l'écoulement imposée, la taille des particules et la présence de particules voisines.

Expression des efforts hydrodynamiques exercés sur une particule isolée

Dans le cas idéal d'une particule isolée soumise à un écoulement linéairement cisailé en régime faiblement inertiel, les expressions des efforts ont été calculées par O'Neill (O'Neill, 1968) et Krishnan & Leighton (Krishnan & Leighton, 1995) :

- force de traînée

$$T = 32 r_p^2 \tau_p i \quad (1)$$

- force de portance

$$P = 9,257 r_p^2 \tau_p R_{ep} k \quad (2)$$

- couple hydrodynamique

$$\Gamma_0 = 11,9 r_p^3 \tau_p j \quad (3)$$

avec r_p : rayon de la particule (m)

τ_p : contrainte de cisaillement (Pa)

R_{ep} : nombre de Reynolds particulaire

Écoulement dans un canal sur le fond duquel est déposé un grand nombre de particules

L'expression des efforts présentée ci-dessus n'est valable que dans le cas d'un écoulement linéairement cisailé autour d'une particule sphérique isolée sur une surface plane. Généralement, l'écoulement cisailé au voisinage de la particule est créé par un écoulement de fluide dans une cellule à section rectangulaire (Lorthois, *et al.*, 2001). Dans cette méthode, la hauteur du canal et la présence de particules voisines sont des paramètres influençant les efforts hydrodynamiques créés par l'écoulement sur les particules. Afin de déterminer l'erreur commise sur l'expression de la force de traînée et du couple hydrodynamique appliqués par l'écoulement sur une particule non isolée dans un canal bidimensionnel plan, Brooks et Tozeren (Brooks & Tozeren, 1996) ont résolu numériquement l'équation de Stokes par la méthode des différences finies. Le domaine tridimensionnel étudié par ces auteurs est constitué d'un canal, formé de deux plaques parallèles espacées d'une distance L , dans le fond duquel un ensemble de sphères est déposé périodiquement suivant un réseau carré de côté d . Des conditions de symétrie sont imposées sur les faces latérales ainsi que des conditions de périodicité en entrée et en sortie du domaine. Ces auteurs ont montré que, pour des particules de rayon fixé, la force de traînée et le couple hydrodynamique décroissent lorsque la hauteur du canal et la distance inter-particulaire diminuent. En outre, les expressions de O'Neill (O'Neill, 1968) sont valides à 1 % près si le rapport entre taille des particules et hauteur du

canal est inférieur à 1/15 et si la distance inter-particulaire est supérieure à $5r_p$. A noter que dans la présente étude, ces deux critères ont été respectés.

4.2.2. Application à l'adhésion bactérienne

En complément de l'AFM, la chambre à écoulement cisailé est un outil performant pour l'étude de l'adhésion microbienne aux surfaces (Busscher & van Der Mei, 1995 ; Guillemot, *et al.*, 2006), à l'échelle de l'ensemble de la population bactérienne. Avec l'aide de la microscopie optique et de l'analyse d'images, l'adhésion microbienne peut être suivie *in situ* et en temps réel, en tenant compte des paramètres environnementaux (physico-chimie, hydrodynamique).

La chambre à écoulement a ainsi été mise en œuvre pour caractériser l'adhésion, la croissance et le détachement de *Streptococcus mutans* sur l'émail dentaire, avec notamment la mise en évidence de l'importance de la phase de maturation du biofilm (cellules adhérees vs. biofilm mature) sur la résistance au détachement, du fait de forces de cohésion accrues au sein du biofilm (Landa, *et al.*, 1997 ; Landa, *et al.*, 1999). Dans une optique de meilleure compréhension de certaines infections oropharyngées, la co-adhésion des levures et des bactéries (Millsap, *et al.*, 2000) a également été caractérisée avec, en fonction des souches en présence, des effets antagonistes ou synergiques. En particulier, *Rothia dentocariosa* et *Staphylococcus aureus* GB 2/1 semblent promouvoir l'adhésion de la levure pathogène *Candida albicans*. Enfin, l'influence des antibiotiques (vancomycine) sur l'adhésion d'*Enterococcus faecalis* au caoutchouc de silicone a été évaluée (Gallardo-Moreno, *et al.*, 2001).

Dans d'autres études réalisées au LISBP (Guillemot, *et al.*, 2006 ; Guillemot, *et al.*, 2007), des expériences de détachement ont été menées dans une chambre à écoulement cisailé, en utilisant la levure modèle *S. cerevisiae* en contact avec une surface d'acier inoxydable 316L. Des supports non métalliques (polypropylène, polystyrène et verre), couvrant une large variété de propriétés de surface (rugosité, composantes polaires et apolaires), ont été utilisés comme référence. Dans des conditions physico-chimiques données (pH, force ionique), l'acier inoxydable présente un comportement spécifique, caractérisé par une forte adhésion de la levure, c'est-à-dire qu'aucun détachement significatif des levures n'a été observé, même avec une contrainte de cisaillement appliquée maximale de 80 Pa. Par ailleurs, la force d'adhésion au polystyrène a pu être quantifiée puis comparée aux données de

la littérature obtenues notamment par AFM, avec un degré de corrélation satisfaisant (Guillemot, *et al.*, 2007). Hormis cette dernière étude, étendue par la suite à la modélisation de la force d'interaction entre spores de *Bacillus cereus* et acier inoxydable (Mercier-Bonin, *et al.*, 2011), il faut souligner que, lorsqu'il s'agit de microorganismes, les expériences de détachement effectuées sont rarement interprétées de manière à obtenir des informations précises sur le niveau des forces d'adhésion. Au contraire, les travaux sur les interactions spécifiques biologiques, telles que les interactions ligand/récepteur (Cozens-Roberts, *et al.*, 1990 ; Kuo & Lauffenburger, 1993) ou les interactions moléculaires fibrine/fibrine (Lorthois, *et al.*, 2001) sont, en général, beaucoup plus aboutis et quantitatifs.

Le couplage des deux approches AFM/chambre à écoulement cisailé pour une meilleure maîtrise des processus d'interaction n'a été que très peu décrit dans la littérature. Il faut toutefois évoquer les travaux de Xu *et al.* (Xu, *et al.*, 2008) sur les interactions *S. aureus*/fibronectine. Les auteurs ont étudié l'adhésion puis la désorption de deux souches de *S. aureus*, dotées ou non d'adhésines spécifiques de la fibronectine (« Fibronectin-Binding-Proteins » - FnBPs) sur une surface de verre fonctionnalisée avec de la fibronectine (Fn), soit par AFM soit en conditions dynamiques en chambre à écoulement. Comme attendu, la souche portant des protéines FnBPs en surface adhère plus que la souche sans FnBPs et ce, selon les deux méthodes. Le renforcement au cours du temps des interactions entre *S. aureus* et la surface fonctionnalisée avec Fn a également été mis en évidence, ainsi que le mode différent entre AFM et chambre à écoulement pour sonder le processus d'adhésion spécifique (pénétration de la pointe dans l'échantillon en AFM, conditions plus « douces » avec la chambre à écoulement).

A noter qu'à notre connaissance, il n'existe aucune donnée de la littérature sur la quantification de l'adhésion des BL en chambre à écoulement cisailé. Nous présenterons, dans la partie *Résultats III-2.2 et 2.3*, les résultats obtenus avec cette méthode, avec une intégration des données AFM pour une meilleure compréhension de la muco-adhésion chez *L. lactis*.

4.3. Microbalance à quartz à mesure de dissipation (QCM-D)

La microbalance à quartz (QCM), utilisée depuis plus de 50 ans pour analyser les changements de masse sur des surfaces rigides, constitue un système très efficace dans l'air, sous vide ou en milieu liquide. Le principe général repose sur l'application d'une tension à un cristal de quartz, en le faisant osciller à une fréquence spécifique. La microbalance à quartz permet de mesurer de très faibles masses (équivalentes à une monocouche d'atomes), en temps réel, avec une sensibilité élevée (seuil de 1 ng/cm² (O'Sullivan & Guilbault, 1999)) et une grande spécificité. Shons *et al.* (Shons, *et al.*, 1972) ont utilisé la microbalance à quartz comme transducteur pour la détection des anticorps de l'albumine de sérum bovin (BSA). Par ailleurs, Fawcett *et al.* (Fawcett, *et al.*, 1988) ont été les premiers à décrire l'utilisation de la QCM pour la mesure des variations de masse induites par l'hybridation des brins d'ADN.

La microbalance à quartz est particulièrement attractive pour des applications en tant que biocapteur puisqu'elle permet la mesure d'interactions cellules-surface de manière non invasive (Fatoyinbo, *et al.*, 2007), sans compromettre l'architecture des cellules ni la structure des protéines cellulaires. L'intérêt de cette technique pour mesurer l'adhésion et la prolifération des cellules a tout particulièrement été démontré (Andersson, *et al.*, 2005 ; Marx, *et al.*, 2005 ; Fatoyinbo, *et al.*, 2007 ; Elsom, *et al.*, 2008).

4.3.1. Principe

La QCM comprend un quartz métallisé sur chacune des faces (Figure 9). Une tension alternative est appliquée sur le quartz, induisant sa résonance à une certaine fréquence, variable selon la présence d'espèces chimiques ou biologiques adsorbées. La loi de Sauerbrey (Sauerbrey, 1959) permet de calculer, à partir de la variation de fréquence de résonance (Δf_m), la masse déposée sur la surface (Δm). Cependant, il faut souligner cette équation ne s'applique que pour des dépôts uniformes, rigides et minces.

$$\Delta f_m = -N \frac{2f_0^2}{\sqrt{\rho_q \mu_q}} \frac{\Delta m}{S} = -\frac{C_f}{n} \Delta m \quad (4)$$

Avec :

f_0 : fréquence de résonance intrinsèque du cristal

S : aire de l'électrode (en cm^2)

N : rang de l'harmonique (avec $N = 1, 3, 5, 7, \dots$)

ρ_q : masse volumique du quartz (en g. cm^{-3})

μ_q : module de cisaillement (en $\text{g.cm}^{-1}.\text{s}^{-1}$)

C_f : coefficient de proportionnalité

A noter que les quartz utilisés dans notre étude ont une fréquence de vibration fondamentale égale à 5 MHz et, pour cette fréquence, le coefficient de proportionnalité C_f est égal à $17,7 \text{ Hz.ng}^{-1}.\text{cm}^{-2}$.

Il est également possible d'obtenir une estimation de l'épaisseur (d) de la couche adsorbée :

$$d_{eff} = \frac{\Delta m}{\rho_{eff}} \quad (5)$$

où ρ_{eff} est la densité effective de la couche adsorbée.

Dans la plupart des applications biologiques, le film adsorbé n'est pas rigide et la relation de Sauerbrey n'est alors plus valide. Un film qui est « mou » (viscoélastique) ne sera pas pleinement couplé à l'oscillation du cristal, d'où une sous-estimation de la masse adsorbée sur la surface par la seule relation de Sauerbrey.

Un film mou amortit l'oscillation du cristal. L'amortissement (ou dissipation D) de l'oscillation du cristal est défini comme suit :

$$D = \frac{E_{perdue}}{2\pi E_{accumulée}} \quad (6)$$

où E_{perdue} est l'énergie perdue (dissipée) pendant un cycle d'oscillation et $E_{accumulée}$ l'énergie totale stockée dans l'oscillateur.

Le changement de fréquence de résonance du cristal (Δf) (Figure 9d) est lié à la masse totale oscillante adsorbée à la surface, tandis que le changement de dissipation de l'énergie

(ΔD) (Figure 9e) correspond aux propriétés viscoélastiques de la masse oscillante. Ainsi, les changements de masse adsorbée pour une couche protéique rigide fournissent une variation de fréquence, alors que, pour des masses viscoélastiques telles qu'associées à des biomacromolécules, on observe des variations à la fois en termes de fréquence et de dissipation. La dissipation d'énergie du cristal est alors mesurée en enregistrant la réponse du cristal oscillant librement qui a été mis en vibration à sa fréquence de résonance (microbalance à quartz à mesure de dissipation, QCM-D). Cela donne également la possibilité de passer d'une fréquence fondamentale à des harmoniques (par exemple 15, 25 et 35 MHz). En mesurant la réponse à des fréquences multiples et en appliquant un modèle viscoélastique (modèle de Voigt), le film adsorbé peut être caractérisé en détail (viscosité, élasticité et épaisseur), sous certaines hypothèses simplificatrices (Höök, *et al.*, 2001 ; Irwin, *et al.*, 2005).

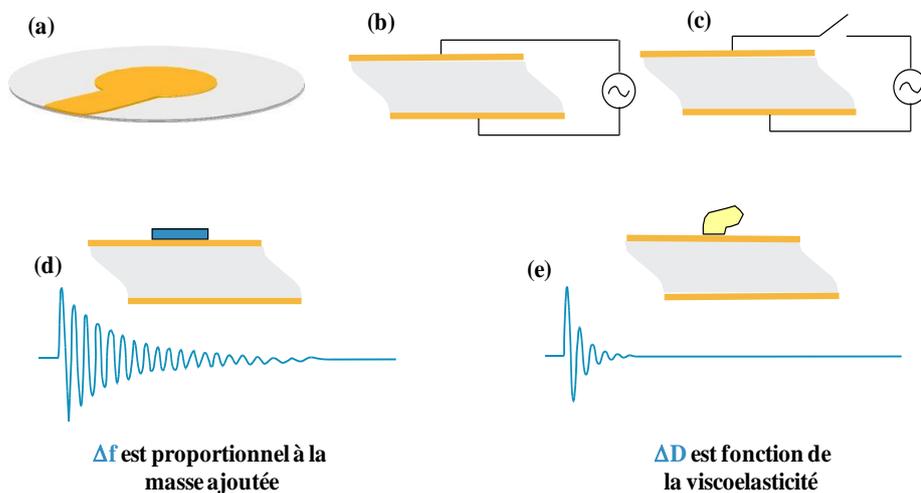


Figure 9. Description de la microbalance à quartz à mesure de dissipation - QCM-D ; (a) capteur QCM-D avec des électrodes en or ; (b) cristal de quartz avec un courant alternatif appliqué entre les électrodes ; (c) court-circuit du courant alternatif ; (d,e) décroissance oscillante quand le disque de quartz est au repos.

4.3.2. Applications à l'adhésion bactérienne

Contrairement aux applications relatives aux interactions entre biomolécules ou avec des cellules (Thorslund, *et al.*, 2007 ; Wittmer, *et al.*, 2007), les études sur les bactéries en QCM-D restent parcellaires, même si nous pouvons noter depuis quelques années une augmentation régulière du nombre de travaux dans le domaine. A signaler que, comme dans

le cas de la chambre à écoulement cisailé, aucune donnée de la littérature ne porte sur l'évaluation du comportement bio-adhésif des BL, et notamment de *L. lactis*, par QCM-D.

Les changements dans les signaux de QCM-D ont été rapportés pour des spores et des bactéries prélevées à différentes phases de croissance (*Bacillus cereus* et *B. subtilis*) (Olofsson, *et al.*, 2005), en relation avec les propriétés anti-adhésives conférées au matériau (acier inoxydable, polystyrène) par un agent chimique, la N-acétyl-L-cystéine (NAC). Les auteurs ont montré que les variations de fréquence et de dissipation étaient dépendantes de la bactérie, de son état physiologique ainsi que de la surface réceptrice (surface vierge ou conditionnée). Une variation de fréquence positive a été observée pour les bactéries en phase exponentielle de croissance et reliée, dans cette étude, à l'hydrophilie de la surface bactérienne. Les auteurs concluent que la fonctionnalisation des surfaces par le composé NAC est efficace, notamment chez les spores de *B. cereus*, en jouant à la fois sur l'adhésion initiale et sur l'aptitude au détachement (*via* les caractéristiques viscoélastiques de la couche déposée) (Olofsson, *et al.*, 2005). Des changements de signaux ont également été observés sur une série de souches de *Streptococcus salivarius* possédant ou non des appendices en surface (Olsson, *et al.*, 2009). En parallèle de l'évolution des paramètres Δf et ΔD , le nombre de bactéries adhérant à la surface du cristal est déterminé en temps réel par microscopie optique. Les résultats montrent que l'adhésion des bactéries dépourvues d'appendices se traduit par une diminution de la fréquence. En revanche, pour les bactéries portant des appendices en surface, les auteurs observent soit une diminution de fréquence beaucoup plus faible soit même une augmentation de fréquence. Il existe, par ailleurs, une corrélation entre la longueur des appendices et la variation de fréquence : plus les appendices sont longs (*i.e.*, distance plus importante entre la bactérie et le capteur), plus le paramètre Δf tend à devenir moins négatif. Ceci est en accord avec une étude antérieure sur *E. coli* où les changements de fréquence moins négatifs sont observés avec les bactéries piliées par rapport à celles non piliées (Otto, *et al.*, 1999). Il faut noter que la réponse en QCM-D pour des biofilms matures (variations de fréquence et de dissipation) a également été caractérisée en temps réel chez *S. mutans* et ce, en fonction du mode de culture (alimentation en continu dès le début ou après la phase d'adhésion en conditions statiques) (Schofield, *et al.*, 2007). Les biofilms formés en adoptant la première stratégie ont une masse plus importante et sont plus dissipatifs (*i.e.* viscoélasticité accrue) que ceux établis selon la seconde stratégie.

Il était communément admis que la présence de bactéries sur un capteur de QCM suit la théorie classique de changement de masse, c'est-à-dire que la masse adsorbée est détectée

comme une variation négative de fréquence, comme illustré dans les travaux de Schofield *et al.* (Schofield, *et al.*, 2007) ou (Poitras & Tufenkji, 2009). Toutefois, nous venons de voir qu'il existe un nombre croissant d'exemples où l'adhésion de particules colloïdales, notamment des bactéries, entraîne des changements positifs de fréquence (Olofsson, *et al.*, 2005 ; Molino, *et al.*, 2008 ; Olsson, *et al.*, 2009 ; Pomorska, *et al.*, 2010). La théorie conventionnelle de chargement de masse ne peut expliquer ces changements positifs de fréquence. Cela signifie que l'adhésion des particules colloïdales à la surface du capteur de QCM-D n'est pas identique à celle obtenue avec des molécules. Outre les hypothèses évoquées précédemment (hydrophilie de la surface microbienne, présence d'appendices...), les changements positifs de fréquence s'expliquent plutôt selon un glissement de particules sur la surface (Berglin, *et al.*, 2008), et/ou en termes d'un couplage entre deux oscillateurs *via* un point de contact faible, ce qui, contrairement à la théorie normale de chargement de masse, peut augmenter la fréquence de résonance (Dybwad, 1985). Dans cette théorie qu'on appelle « oscillateur couplé », modélisée ultérieurement par Pomorska *et al.* (Pomorska, *et al.*, 2010) en milieu liquide en utilisant la méthode des éléments finis, la fréquence de résonance n'est pas seulement affectée par la masse adsorbée, mais aussi par la rigidité de la liaison entre la masse adsorbée et la surface du cristal. Ce concept d'oscillateur couplé a été récemment appliqué à *Staphylococcus epidermidis*, en soulignant l'effet de la rigidité de l'interface bactérie/substrat (Olsson, *et al.*, 2011). Les auteurs ont également indiqué le rôle antagoniste potentiel de l'excrétion des exopolysaccharides dans la réponse observée en QCM-D.

Nous présenterons dans la partie *Résultats (chapitre III - 2.1)* les avancées réalisées dans la présente étude sur le comportement muco-adhésif de *L. lactis* par QCM-D (nature et viscoélasticité de la couche de bactéries déposées, en relation avec la souche et la surface réceptrice).

Partie II – Objectifs et Programme de travail



**Laboratoire d'Analyse et
d'Architecture des Systèmes,
Toulouse**



**Laboratoire d'Ingénierie des
Systèmes Biologiques et des
Procédés, Toulouse**



**Unité de Glycobiologie
Structurale et Fonctionnelle,
Villeneuve d'Ascq**



**Laboratoire de Physico-
Chimie des Surfaces, Paris**



**Institut de Biochimie et de
Biophysique, Varsovie,
Pologne**



**Institut MICALIS,
Jouy-en-Josas**

1. Questions scientifiques et objectifs du travail

A travers la synthèse bibliographique présentée ci-dessus, nous avons pu constater les enjeux majeurs liés à l'utilisation des bactéries lactiques, et notamment la bactérie modèle *L. lactis*, non seulement pour l'élaboration d'aliments fonctionnels à l'intersection alimentation/santé (probiotiques), mais également pour des applications thérapeutiques (vaccins vivants, délivrance de médicaments). Pour l'ensemble de ces cibles potentielles, la maîtrise des interactions avec l'épithélium intestinal de l'hôte semble une problématique cruciale. Dans ce contexte, les effets de la couche de mucus, *via* l'un de ses constituants-clés, les mucines, restent largement méconnus. Les mucines jouent pourtant un rôle important dans le tractus gastro-intestinal à la fois sur les propriétés viscoélastiques du gel de mucus et sur les interactions biologiques entre l'hôte et le microbiote endogène ou exogène (bactéries commensales, probiotiques ou pathogènes, microbiote alimentaire).

Ma thèse, intitulée « Identification et caractérisation des déterminants physico-chimiques et biologiques mis en jeu dans l'adhésion de *Lactococcus lactis* à la mucine modèle PGM », s'est déroulée au sein du Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP), en collaboration avec le Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (LAAS), en s'appuyant également sur des partenaires académiques, spécialisés sur les mucines et leur profil de glycosylation (Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle de Villeneuve d'Ascq) ainsi que sur l'identification et la caractérisation de souches de *L. lactis* originales (Institut MICALIS de Jouy-en-Josas). L'objectif de ce travail a été de caractériser *in vitro* le comportement de *L. lactis* vis-à-vis de son adhésion aux mucines sur un large panel de souches naturelles ou recombinantes, dotées de propriétés de surface différentes, *via* la mise à profit de la biodiversité naturelle observée chez les lactocoques puis la modulation des déterminants moléculaires clés, présents sur la paroi bactérienne (protéines à domaines MUB, pili). L'ensemble du projet a été réalisé sur la mucine modèle PGM (« Pig Gastric Mucin »), largement décrite dans la littérature au niveau structural et fonctionnel. **Il s'agit donc de la première étude *in vitro* sur la force d'adhésion de *L. lactis* à une surface biomimétique fonctionnalisée avec PGM, ainsi que sur les mécanismes d'interaction sous-jacents, afin de mieux comprendre la muco-adhésion d'une bactérie « positive » (propriétés technologiques, potentiel probiotique, intérêt médical) dans une optique d'application(s) à l'interface alimentation/santé.**

Ce projet s'inscrit dans une compréhension mécanistique fine des interactions *L. lactis*/PGM, à l'intersection de différents champs disciplinaires (microbiologie, physique, chimie). Les principales questions auxquelles nous avons tenté de répondre ont été les suivantes : quelles sont les capacités d'adhésion de *L. lactis* à PGM ? Dans quelle mesure les propriétés physico-chimiques de la bactérie permettent-elles d'expliquer sa capacité d'adhésion ? De quelle manière les interactions biologiques spécifiques sont-elles impliquées dans l'adhésion de *L. lactis* à PGM ? Connaissant les paramètres physico-chimiques et biologiques mis en jeu, comment la force d'adhésion peut-elle être modélisée ?

2. Stratégie mise en œuvre et articulation des différents chapitres de résultats

Pour répondre aux questions posées, le travail est basé sur la combinaison de plusieurs volets, abordés de manière conjointe ou distincte dans les différents chapitres présentés : **(i)** caractérisation des propriétés de surface de *L. lactis* (charge, hydrophobie) et de la couche de PGM (épaisseur, rigidité, structure, composition) en utilisant le couplage de techniques d'analyse multi-échelles (microélectrophorèse, méthode « Microbial adhesion to solvents »-MATS, AFM, spectroscopie de photo-électrons induits par rayons X-XPS, microscopie électronique à balayage-MEB, méthode de la goutte posée) ; **(ii)** quantification de la force d'interaction *L. lactis*/surface fonctionnalisée par PGM en mettant à profit les potentialités de différentes techniques complémentaires : couplage d'une technique directe (AFM) et de techniques indirectes sous conditions hydrodynamiques contrôlées (exposition à une force de cisaillement en chambre à écoulement cisailé ; microbalance à quartz à mesure de dissipation - QCM-D), avec des échelles d'observation macro-, micro- et nano-scopiques, permettant de sonder les interactions à l'échelle de la cellule unique jusqu'à l'ensemble de la population bactérienne ; **(iii)** détermination des éléments physico-chimiques et biologiques responsables des interactions entre *L. lactis* et PGM, en faisant varier les propriétés muco-adhésives des souches *via* le criblage de différentes souches naturelles (origine, sous-espèce) puis l'identification et la modulation de certains composés-clés (protéines à domaines MUB, pili) à partir de souches recombinantes ; **(iv)** analyse et modélisation du processus d'interaction *L. lactis*/PGM.

Nous avons basé notre travail sur l'exploitation d'un large panel de souches de *L. lactis* naturelles (origine laitière/végétale) ou recombinantes :

- La souche **IBB477** de la sous-espèce *cremoris* et d'origine laitière, isolée par l'Institut de Biochimie et de Biophysique (IBB) de Varsovie (partenaire polonais du projet), est capable de croître sur lait (résultats non présentés) et présente une forte persistance *in vivo* dans le tractus digestif du rat (de l'ordre de 15 jours contre 2-3 jours pour des souches conventionnelles) (Boguslawska, *et al.*, 2009). La souche de référence choisie est *L. lactis* ssp. *cremoir* **MG1820**. A noter que les propriétés de surface de ces deux souches (charge, hydrophobie) sont présentées au paragraphe III - 1.1.

- La souche naturelle **TIL448**, de la sous-espèce *lactis* et d'origine végétale, provient de l'Institut MICALIS de Jouy-en-Josas. Dotée d'une hydrophobie de surface et d'une électronégativité élevées (Giaouris, *et al.*, 2009), elle présente une forte adhésion aux cellules épithéliales intestinales Caco-2, environ 10 fois supérieure à celle observée avec d'autres souches naturelles (M.P. Chapot-Chartier, résultats non publiés). La souche **TIL1230** (hydrophile) est dérivée de TIL448 par l'élimination de plasmides en utilisant l'acridine orange.

Nous avons également testé des mutants de la souche TIL448 pour étudier plus finement le rôle respectif des protéines à domaines MUB et des pili dans le processus mucor-adhésif chez *L. lactis*. Nous avons ainsi évalué l'adhésion sur PGM de **TIL1289**, souche mutée dans le gène de la Piline et **TIL1290**, souche mutée dans le gène d'une protéine à domaine « MUB-like » (M.P. Chapot-Chartier, résultats non publiés).

- Nous nous sommes enfin focalisés sur le rôle des pili, toujours chez la sous-espèce *lactis*, à partir de la souche de référence IL1403. Nous avons renforcé notre collaboration avec l'Institut MICALIS de Jouy-en-Josas, dans le cadre de la thèse de V. Oxaran sur la biogénèse et la fonctionnalité des pili chez *L. lactis*. Nous avons ainsi testé la souche recombinante *L. lactis* **OpSrtC piliée** (VE17173) en comparant avec la souche **contrôle non piliée** (VE17179).

La stratégie retenue ensuite pour la quantification de la force d'interaction *L. lactis*/PGM repose sur la complémentarité des échelles d'observation et d'analyse.

➤ **A l'échelle de la cellule unique par AFM** : les outils et méthodes nécessaires à la **quantification directe des interactions *L. lactis*/PGM** ont été développés, validés puis exploités, en utilisant le concept de « lacto-pointe ». Il s'agit de modifier la pointe AFM en attachant les cellules de *L. lactis* au levier. L'avantage de cette méthode est la préservation de l'état natif des bactéries (viabilité, ultrastructure). Nous avons choisi la méthode d'immobilisation par interactions électrostatiques, en considérant comme agent pontant un polycation, le polyéthylène-imine (PEI), compte-tenu de la charge de surface négative des souches étudiées (voir paragraphe III - 1.1). Les pointes AFM ainsi modifiées ont été observées par microscopie (électronique et à épifluorescence) pour vérifier la présence et la viabilité des bactéries immobilisées. Parallèlement, l'adsorption de la mucine modèle PGM sur des coupons en polystyrène (PS) a été étudiée afin d'obtenir une surface biomimétique *in vitro* aux propriétés de surface contrôlées et stables (PS+PGM). Comme mentionné précédemment, différentes techniques d'analyse ont successivement été mises en œuvre : microscopie électronique à balayage – MEB (observation de la couche de PGM), spectroscopie de photo-électrons induits par rayons X – XPS (composition moléculaire, épaisseur), AFM (topographie, taux de recouvrement, propriétés nanomécaniques) et méthode de la goutte posée (caractère hydrophile/hydrophobe). Notons que les analyses XPS ont été réalisées au Laboratoire de Physico-Chimie des Surfaces de Paris.

La caractérisation de la lacto-pointe et de la couche de PGM, ainsi que l'évaluation de la force d'interaction *L. lactis*/PGM sur la souche de référence MG1820, avec l'identification et la distinction des événements non adhésifs, adhésifs non spécifiques et adhésifs spécifiques, sont présentées dans la première publication « **Probing *in vitro* interactions between *L. lactis* and mucins using AFM** », parue dans le journal *Langmuir* en 2010 (voir III - 1.2).

Dans la continuité de cette étude, nous nous sommes focalisés sur la **quantification par AFM des interactions spécifiques *L. lactis*/PGM et la détermination des constantes cinétiques associées**, en considérant la souche contrôle MG1820 et la souche naturelle IBB477. Selon la théorie thermodynamique, une augmentation du taux de chargement (*i.e.*, vitesse de retrait de la pointe après mise en contact avec l'échantillon) conduit à une force d'interaction plus élevée, ce qui peut être relié à la constante cinétique de dissociation (K_{off}). Une augmentation du temps de contact entre la pointe et l'échantillon conduit, quant à elle, à une plus forte probabilité d'interaction, en relation directe avec la constante cinétique d'association (K_{on}). Sur cette base, nous avons fait varier les paramètres opératoires (vitesse

de retrait, temps de contact) lors du suivi de l'interaction lacto-pointe/couche de PGM, afin d'évaluer les constantes cinétiques (K_{on} , K_{off}) permettant d'élucider la dynamique des interactions moléculaires du complexe *L. lactis*/PGM. A l'heure actuelle, il n'existe aucune donnée de la littérature, relative aux constantes cinétiques spécifiques de l'interaction entre bactéries et mucines. Néanmoins, le paramètre K_{off} obtenu dans ce travail a pu être comparé aux valeurs décrites pour différentes biomolécules (protéines, sucres). Afin d'assurer une meilleure compréhension de la spécificité des interactions observées entre *L. lactis* et PGM, nous avons, par ailleurs, effectué des expériences de blocage avec PGM, puis uniquement avec sa partie O-glycannique. L'ensemble des résultats est présenté de manière détaillée dans la deuxième publication « **Measuring kinetic dissociation/association constants between *Lactococcus lactis* bacteria and mucins, using living cell probes** », parue dans le journal *Biophysical Journal* en 2011 (voir III - 1.3).

Forts de ces acquis à la fois scientifiques et méthodologiques, nous avons élargi notre étude à la souche naturelle TIL448. Dans le cadre du partenariat avec l'Institut MICALIS et l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, nous avons pu approfondir nos connaissances sur les processus muco-adhésifs, **en recherchant plus précisément les O-glycannes de PGM ainsi que les déterminants moléculaires de la surface bactérienne impliqués**. Nous avons ainsi effectué des expérimentations AFM en mode spectroscopie de force, selon la méthodologie mise au point sur les souches MG1820 et IBB477. Nous nous sommes tout particulièrement intéressés aux distances de rupture, paramètre directement extrait des courbes de force – distance relatives aux événements spécifiques. Cette analyse nous a permis d'identifier puis de hiérarchiser les déterminants moléculaires (protéine à domaine « MUB-like », pili), mis en jeu dans l'interaction biologique *L. lactis*/PGM. Ces résultats sont détaillés dans le chapitre « **Deciphering the role of surface proteins in the muco-adhesive properties of *L. lactis* with AFM force spectroscopy** » (voir III - 1.4).

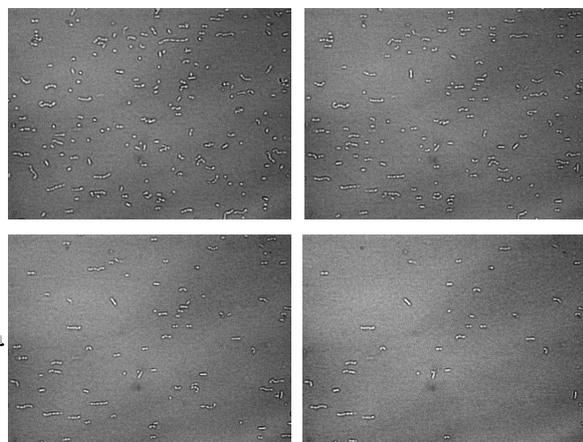
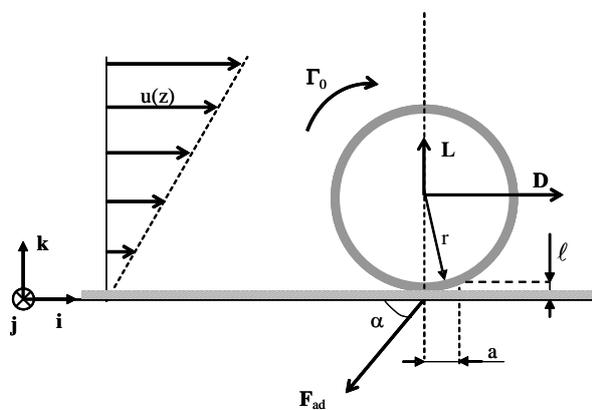
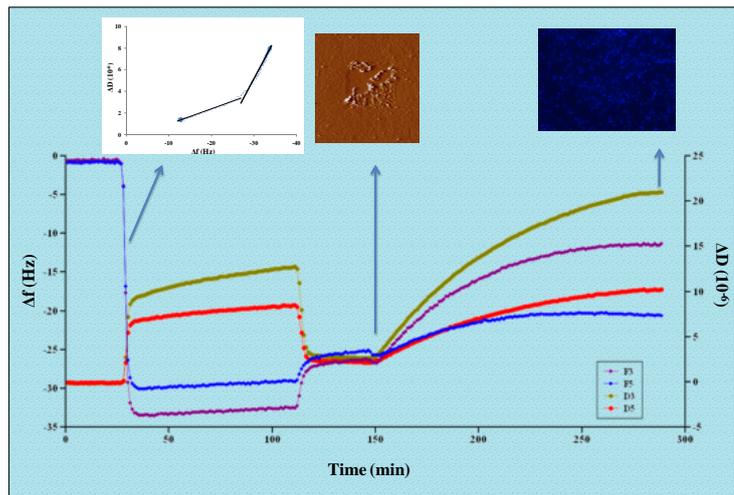
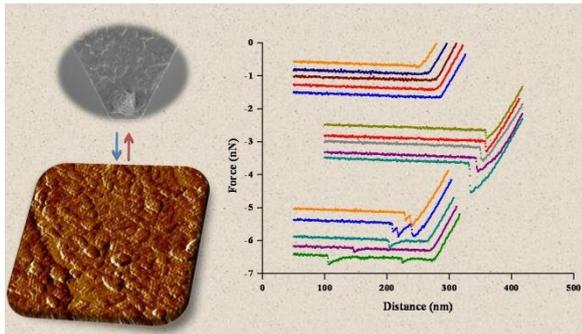
➤ **A l'échelle de l'ensemble de population bactérienne** : nous avons également sondé les interactions entre *L. lactis* et PGM à l'échelle de l'ensemble de la population bactérienne, en conditions dynamiques, en mettant tout d'abord en œuvre la technique de microbalance à quartz à mesure de dissipation (QCM-D). Il s'agit d'un dispositif de mesure des variations de masse à la surface d'une électrode, à l'aide des propriétés piézo-électriques du quartz (voir I-4.3). Le suivi parallèle de la dissipation du système permet de caractériser les

propriétés viscoélastiques de la couche déposée. Le système QCM-D a été mis en œuvre pour appréhender *in situ* l'adsorption de PGM sur la surface abiotique de polystyrène puis l'adhésion bactérienne aux surfaces PS et PS+PGM en solution saline, avec en parallèle la quantification par microscopie à épifluorescence du nombre de cellules totales adhérentes. Les souches retenues pour cette étude sont IBB477 et MG1820. Nous avons pu évaluer la composition, l'épaisseur et la viscoélasticité de la couche de PGM à l'aide du modèle de Voigt puis confirmé les différences dans les propriétés muco-adhésives des souches MG1820 et IBB477 vis-à-vis de PS et PS+PGM, à l'échelle de la population bactérienne. L'ensemble de ces résultats est présenté dans notre troisième publication « **Real-time investigation of *Lactococcus lactis* muco-adhesive properties using quartz crystal microbalance with dissipation monitoring** », soumise à *Langmuir* en septembre 2011 (voir III -2.1).

Nous avons poursuivi notre étude sur **l'effet des conditions d'écoulement appliquées à la muco-adhésion bactérienne, l'objectif ici étant de relier les échelles cellule unique vs. population entière, pour *in fine* modéliser le processus d'interaction *L. lactis* / PGM** pour les souches IBB477 et MG1820. La chambre à écoulement cisailé, développée au LISBP (Guillemot, *et al.*, 2006 ; Guillemot, *et al.*, 2007 ; Mercier-Bonin, *et al.*, 2009 ; Mercier-Bonin, *et al.*, 2011), a alors été mise en œuvre pour suivre *in situ* le détachement des bactéries *L. lactis* adhérentes, dans des conditions d'écoulement laminaire contrôlées. L'observation directe du comportement bio-adhésif des bactéries par microscopie optique, à différents paliers de débit de circulation, combinée au traitement ultérieur des images obtenues, permet d'accéder à plusieurs grandeurs caractéristiques, telles que la contrainte de cisaillement nécessaire au détachement de 50 % des bactéries initialement adhérentes ($\tau_{P50\%}$). L'un des avantages de la chambre à écoulement cisailé, outre la possibilité d'une quantification *in situ*, est d'avoir accès de façon précise à l'équilibre des forces et moments hydrodynamiques s'exerçant sur la bactérie adhérente, soumise à l'écoulement cisailé. Nous avons pu ainsi déterminer la force d'adhésion entre *L. lactis* et PGM pour IBB477 et MG1820 puis comparer avec les données AFM pour proposer une modélisation mécanistique du processus muco-adhésif chez IBB477. Ces résultats font l'objet du chapitre « **Detachment of *L. lactis* from PGM-coated surfaces under controlled shear flow: modeling of the adhesion force** » (voir III - 2.2).

Nous avons complété notre étude sur l'effet des conditions d'écoulement appliquées à la muco-adhésion bactérienne, en nous focalisant sur la souche de *L. lactis* piliée (*L. lactis* OpSrtC) et la souche contrôle non piliée. En effet, dans l'environnement *in vivo*, les cellules sont parfois soumises à des fluctuations hydrodynamiques, permettant sous certaines conditions un ancrage renforcé à la muqueuse. Ce phénomène de « shear-enhanced microbial adhesion » a été décrit dans la littérature pour une souche d'*E. coli* piliée (Thomas, *et al.*, 2002 ; Thomas, *et al.*, 2004 ; Nilsson, *et al.*, 2006). Les auteurs ont observé une consolidation, induite par le cisaillement, de l'interaction entre l'adhésine (*fimbriae* de type 1 *via* la sous-unité FimH) et son ligand, le mannose. Les mêmes tendances ont été plus récemment décrites chez la bactérie à Gram positif *Streptococcus gordonii* (Ding, *et al.*, 2010). Afin d'investiguer **la relation entre hydrodynamique, muco-adhésion bactérienne et pili de surface chez *L. lactis***, nous avons repris la méthodologie en chambre à écoulement cisailé mise au point pour les souches IBB477 et MG1820. Nous avons en parallèle effectué des expérimentations AFM pour confronter les deux échelles d'analyse. Ce travail fait l'objet du dernier chapitre « **Unraveling at multi-scale the role of pili in *Lactococcus lactis* muco-adhesion** » (voir III - 2.3).

Partie III – Résultats de la thèse



1. A l'échelle de la cellule unique

1.1. Caractérisation physico-chimique des souches IBB477 et MG1820²

Avant de réaliser les expérimentations AFM en spectroscopie de force pour sonder les interactions *L. lactis*/PGM, nous avons mesuré l'hydrophobie et la charge des souches IBB477 et MG1820, en utilisant la méthode MATS (« Microbial Adhesion To Solvents ») (Vesterlund, *et al.*, 2005), l'AFM et la microélectrophorèse (James, 1991), respectivement. L'évaluation de l'hydrophobie de surface par AFM est présentée sur la Figure 10.

Nous avons utilisé la méthode décrite par Dague *et al.* (Dague, *et al.*, 2007) pour l'estimation de l'hydrophobie de la surface bactérienne à l'aide d'une pointe fonctionnalisée –CH₃. En effet, les leviers AFM Si₃N₄, avec des constants de raideur de 0,01N/m (Microlevers, Veeco Metrology Group, Santa Barbara, CA) ont été recouverts avec 5 nm d'épaisseur d'une couche de chrome suivie d'une couche d'or de 30 nm par faisceau d'électrons. Les leviers ont été ensuite immergés pendant 14h à 1 mM de solutions de HS(CH₂)₁₁CH₃ dans l'éthanol puis rincés avec l'éthanol. La qualité de la pointe –CH₃ réalisée a tout d'abord été validée en mesurant la force d'adhésion à des surfaces contrôle (verre, polystyrène vierge et polystyrène avec couche de PGM). Nous retrouvons le caractère très hydrophile du verre avec 98 % d'événements non adhésifs (Figure 10-a). Le polystyrène présente, quant à lui, une hydrophobie de surface marquée, avec seulement 4 % d'événements non adhésifs et une force d'adhésion moyenne de l'ordre de 1,7 nN (Figure 10-c). Après adsorption de PGM, la surface présente un caractère intermédiaire entre ceux du verre et du polystyrène, avec 80 % d'événements non adhésifs (Figure 10-b). En parallèle, la mesure de l'hydrophobie des différentes surfaces solides a été effectuée de manière macroscopique par la méthode de la goutte posée. Nous obtenons un angle de contact avec l'eau milliQ de 10,5° ± 0,9° ; 98,5° ± 2,9° et 58,5° ± 5,7° pour le verre, le polystyrène vierge et le polystyrène après adsorption de PGM, respectivement. Ces données confirment les résultats AFM, validant de ce fait l'utilisation de la pointe –CH₃ pour estimer l'hydrophobie de la surface bactérienne pour les souches IBB477 et MG1820. Ces deux souches sont proches en termes de caractère

² A noter que pour les autres souches étudiées dans ce travail, les données sur les propriétés de surface sont soit disponibles (Giaouris *et al.*, 2009 pour TIL448), soit en cours de valorisation (manuscrit d'Oxaran *et al.* en préparation pour les souches VE17173 et VE17179).

hydrophobe (Figures 10d et 10e). Elles présentent des pourcentages d'événements non adhésifs du même ordre de grandeur et des valeurs de force d'adhésion voisines. Ces résultats sont confirmés par les tests effectués à l'échelle globale par la méthode MATS (Figure 11a). Les affinités des deux souches vis-à-vis des différents solvants sont proches, et notamment pour les deux solvants apolaires (hexadécane et décane) (Figure 11a), indiquant un caractère moyennement hydrophobe.

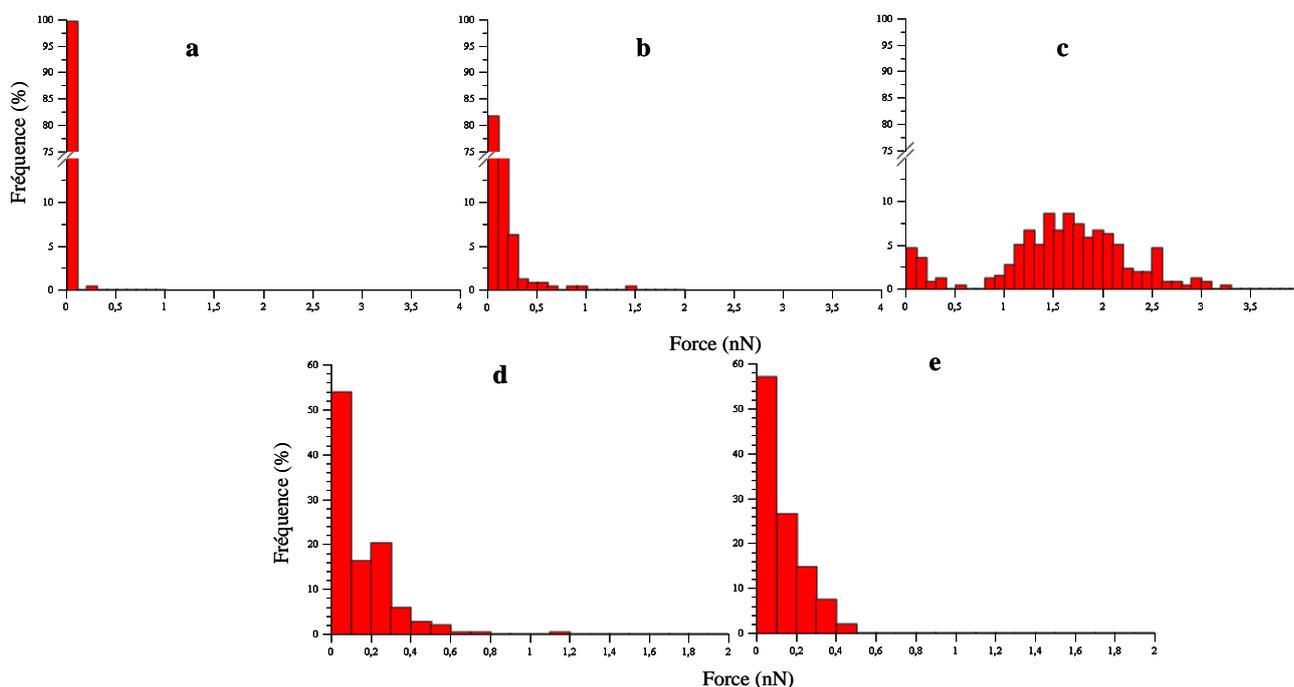


Figure 10. Histogrammes de force d'adhésion entre la pointe $-CH_3$ et différentes surfaces abiotiques et biotiques ; (a) verre, (b) polystyrène avec couche de PGM, (c) polystyrène vierge, (d) souche IBB477, (e) souche MG1820. Pour les mesures réalisées sur ces deux souches, les bactéries, prélevées en phase stationnaire de croissance puis lavées dans du tampon PBS, sont piégées dans les pores d'un filtre (taille de pore de $0,8 \mu m$). Les courbes force-volume sont enregistrées par AFM sur une zone de $500 \times 500 \text{ nm}^2$ (matrices de 32×32 courbes de force). La force appliquée est maintenue à 1 nN, avec une vitesse de balayage de 4,34 Hz.

Le profil d'évolution de la mobilité électrophorétique en fonction du pH, présenté sur la Figure 11b, est identique pour IBB477 et MG1820. Les deux souches sont fortement chargées négativement (mobilité électrophorétique d'environ $3,8 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$ à pH=7) et un point isoélectrique *a priori* très bas (impossible à déterminer dans la gamme expérimentale testée), en relation avec la composition en acides téichoïques de la paroi bactérienne (Schär-Zammaretti & Ubbink, 2003). Cette charge de surface élevée est une propriété importante pour les étapes ultérieures de construction et d'utilisation de la lacto-pointe pour les tests d'interaction avec la couche de PGM (voir parties III - 1.2 et 1.3).

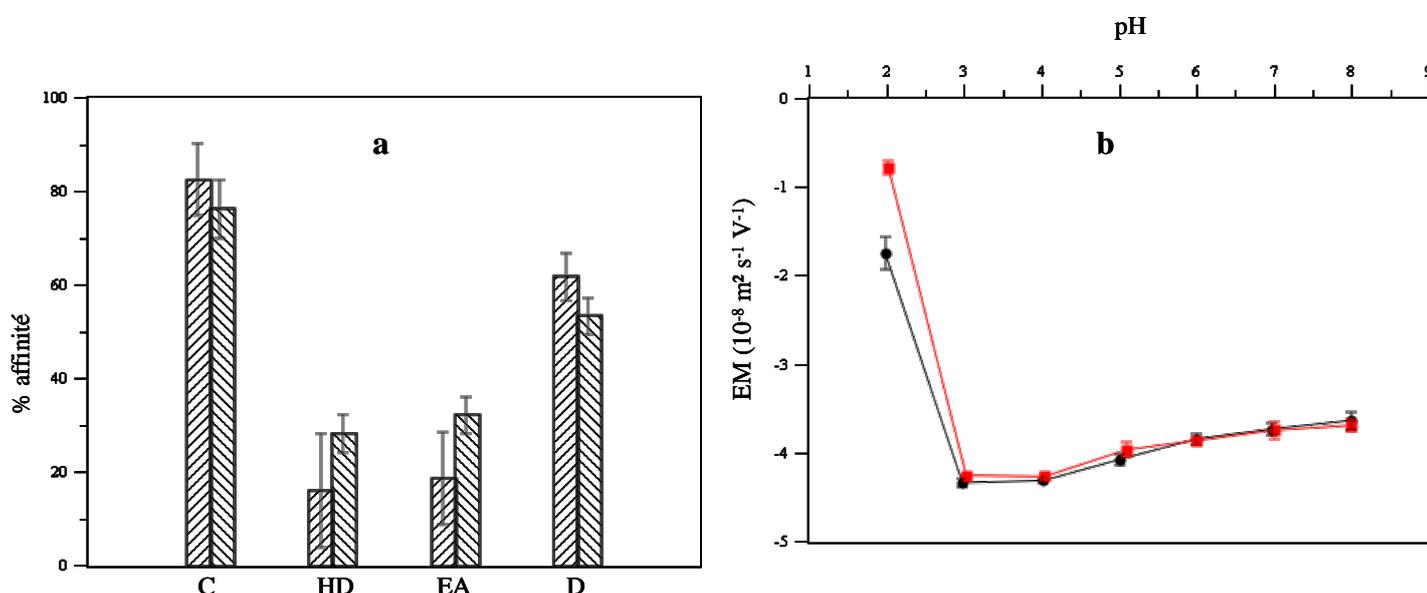


Figure 11. (a) comparaison des résultats MATS pour la souche IBB477 (▨) et la souche MG1820 (▩). C : chloroforme, HD : hexadécane, EA : acétate d'éthyle, D : décane ; (b) mobilité électrophorétique (EM) en fonction du pH pour IBB477 (■) et MG1820 (●). Pour les mesures MATS, les bactéries sont prélevées en phase stationnaire de croissance puis lavées dans NaCl 150 mM. Le protocole pour la détermination du pourcentage d'affinité de la suspension bactérienne aux différents solvants est inspiré de celui décrit par Guillemot *et al.* (2007). Pour la mesure de la mobilité électrophorétique, les bactéries sont prélevées en phase stationnaire de croissance puis lavées dans KNO₃ 1 mM. Les mesures sont effectuées à différents valeurs de pH par ajustement avec KOH ou HNO₃ 0,01 M. Les résultats présentés sont les moyennes et écart-types de trois expériences indépendantes.

1.2. Quantification directe des interactions *L. lactis*/ PGM par AFM

Probing *in vitro* interactions between *Lactococcus lactis* and mucins using AFM

Objectif : ce travail, réalisé sur la souche de référence *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1820, vise à démontrer la faisabilité de la méthode, basée sur la spectroscopie de force AFM pour quantifier à l'échelle de la cellule unique la force d'interaction *L. lactis*/surface fonctionnalisée par la mucine modèle PGM (« Pig Gastric Mucin »).

Matériels et méthodes : l'adsorption de PGM sur des coupons en polystyrène (PS) a été étudiée afin d'obtenir une surface biomimétique *in vitro* (PS+PGM) aux propriétés de surface stables et contrôlées. L'adsorption est réalisée à température ambiante, sous agitation douce, pendant 16 h, à une concentration de PGM de 10 mg/mL. Pour caractériser la couche de mucine PGM adsorbée, nous avons utilisé plusieurs techniques d'analyse multi-échelles : méthode de la goutte posée (caractère hydrophile/hydrophobe), XPS (composition moléculaire, épaisseur), MEB (observation de la couche de PGM) et AFM (topographie, taux de recouvrement, propriétés nanomécaniques). Afin de mesurer la force d'interaction entre les bactéries et la couche de PGM, nous avons modifié la pointe AFM en immobilisant les cellules de *L. lactis* sur le levier (« lacto-pointe ») par interactions électrostatiques. L'avantage de cette méthode est la préservation de l'état natif des cellules (viabilité, ultrastructure). Les mesures AFM ont été effectuées dans l'eau milliQ. La force d'adhésion *L. lactis*/PGM a été déduite de l'analyse des courbes de force au retrait, en comparaison avec la surface de polystyrène vierge.

Résultats : la couche de PGM est hydrophile et homogène, avec une épaisseur de 3,4 nm. Les oligosaccharides sont exposés en extrême surface. Ceci se traduit par un effet anti-adhésif de PGM vis-à-vis des bactéries (par rapport à la surface PS vierge). Nous avons ensuite pu quantifier la force d'adhésion de MG1820 à PGM ($0,12 \pm 0,06$ nN). L'analyse des courbes de force a permis de dissocier (i) les événements non adhésifs (courbes de force ne montrant aucune adhésion lors du retrait de la pointe de la surface), (ii) les événements adhésifs non spécifiques (typiques d'interactions physico-chimiques électrostatiques, (a)polaires...) et les événements adhésifs spécifiques de type « ligand/récepteur » (courbes montrant un, deux ou trois événements adhésifs à plusieurs nanomètres de distance du point de contact).

Probing In Vitro Interactions between *Lactococcus lactis* and Mucins Using AFMEtienne Dague,^{*,†,‡,⊥} Doan Thanh Lam Le,^{†,‡,§,⊥} Sandrine Zanna,^{||} Philippe Marcus,^{||} Pascal Loubière,[§] and Muriel Mercier-Bonin^{*,§}

[†]CNRS, LAAS, 7 Avenue du Colonel Roche, F-31077 Toulouse, France, [‡]Université de Toulouse, UPS, INSA, INP, ISAE, LAAS, F-31077 Toulouse, France, [§]Université de Toulouse, INSA, UPS, INPT, LISBP, 135 Avenue de Rangueil, F-31077 Toulouse, France, ^{||}INRA, UMR792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400 Toulouse, France, and [⊥]CNRS, UMR5504, F-31400 Toulouse, France, and ^{||}Laboratoire de Physico-Chimie des Surfaces, CNRS/ENSCP, UMR7045, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris (Chimie Paristech), 11 rue P. et M. Curie, F-75005 Paris, France. [⊥]E.D. and D.T.L.L. contributed equally to this work

Received January 7, 2010

This work was devoted to the first AFM investigation of the adhesion force to pig gastric mucin (PGM) using *Lactococcus lactis* as the model for lactic acid bacteria. The PGM coating on polystyrene was characterized using a complementary set of multiscale analytical methods, including AFM (HarmoniX mode), XPS, and the sessile drop method. The PGM layer, which was mainly composed of C–O, C–N, COOH, CONH, and sulfur-related species (protein core and oligosaccharide side chains), was quite homogeneous and hydrophilic, with an estimated thickness of 3.4 nm. *L. lactis* cells were immobilized on the AFM tip (lacto probe) and used as a force probe to measure the interaction forces between bacteria and PGM-coated polystyrene on the nanoscale. After mucin adsorption, adhesion force levels were lower because of the interplay of electrostatic, hydrophilic, and steric repulsions. For example, the adhesion forces of the lacto probe to bare and PGM-coated polymer were 0.74 ± 0.10 and 0.12 ± 0.06 nN, respectively. The shape analysis of retraction force–distance curves highlighted the contribution of both nonspecific and specific forces (ligand/receptor bonding). The lacto probe concept and the associated AFM measurements may now provide a powerful framework for understanding interaction mechanisms between mucins and lactic acid bacteria.

Introduction

The human gut microbiota is part of a highly complex bacterial ecosystem, and several hundred different types of bacteria have been shown to colonize the gut.¹ Because they grow in close juxtaposition to host cells, mucosal bacteria are thought to play a particularly important role in gut health, and distinct bacterial populations have been observed to occur on the gut epithelium in both health- and disease-related processes.² Ahmed et al.³ recently demonstrated the mucosa-associated bacterial diversity in the human distal small bowel and colon, in relation to regiospecific colonization, probably mediated by mucins that provide an enormous repertoire of potential binding sites for microorganisms.⁴ Despite being a structurally diverse group, mucins, which are the major protein component of the mucus covering the epithelium of the gastrointestinal tract, share common features including high degrees of O-glycosylation, glycosylated regions rich in repeats of proline, threonine, and serine (PTS regions), and nonglycosylated regions containing structural elements involved in mucin interactions. Mucins have been shown to be

overexpressed in cancer⁵ and have recently been proposed as a target for diagnosis and therapy.^{6,7}

Several studies have shown that adhesion is a prerequisite for the colonization of bacteria and a key mechanism for their probiotic activity, especially for lactic acid bacteria.^{8,9} Strains with the highest adhesion ability exhibit great effects on host health and performance. In contrast, pathogens with lower adhesion ability are less virulent toward the host. Indeed, they need to adhere to the mucus, integrate into the mucosal community, and reach the epithelium before they can cause infections.¹⁰ Therefore, physical interaction with exposed host surfaces, especially the mucus layer, is undoubtedly an important trait in understanding and improving the gut ecology through the balance of putative beneficial over pathogenic bacteria. In this framework, there is clearly a need for in vitro models targeting the mucosal adhesion of intestinal bacteria. Van den Abbeele et al.¹¹ recently reported an in vitro adhesion assay to study the mucin colonization of bacteria from a mixed microbial community derived from the simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME). Adhesion to mucins, which was the interplay between nonspecific and specific interactions, differed substantially between bacteria and was maximal for lactobacilli. However, this pioneering study mainly focused on the variability

*Corresponding authors. (E.D.) Tel: +33 (0) 561 337 841. Fax: +33 (0) 561 336 208. E-mail: edague@laas.fr. (M.M.-B.) Tel: +33 (0) 561 559 419. Fax: +33 (0) 561 559 400. E-mail: muriel.mercier-bonin@insa-toulouse.fr.

(1) Eckburg, P. B.; Bik, E. M.; Bernstein, C. N.; Purdom, E.; Dethlefsen, L.; Sargent, M.; Gill, S. R.; Nelson, K. E.; Relman, D. A. *Science* **2000**, *10*, 1635.

(2) Macfarlane, S.; Hopkins, M. J.; Macfarlane, G. T. *Micro. Ecol. Health Dis.* **2000**, *2*, 64.

(3) Ahmed, S.; Macfarlane, G. T.; Fite, A.; McBain, A. J.; Gilbert, P.; Macfarlane, S. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 7435.

(4) Robbe, C.; Capon, C.; Coddeville, B.; Michalski, J. C. *Biochem. J.* **2004**, *384*, 307.

(5) Singh, A. P. *Prostate* **2006**, *66*, 421.

(6) Singh, A. P.; Chaturvedi, P.; Batra, S. K. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 433.

(7) Mall, A. S. J. *Clin. Pathol.* **2008**, *61*, 1018.

(8) Gusils, C.; Morata, V.; González, S. *Methods Mol. Biol.* **2004**, *268*, 411.

(9) Ouwehand, A. C.; Kirjavainen, P. V.; Shortt, C.; Salminen, S. J. *Int. Dairy J.* **1999**, *9*, 43.

(10) Finlay, B. B.; Falkow, S. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1997**, *61*, 136.

(11) Van den Abbeele, P.; Grootaert, C.; Possemiers, S.; Verstraete, W.; Verbeke, K.; Van de Wiele, T. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *83*, 349.

in mucin colonization ability among bacterial groups, in relation to matrix and carbohydrate effects. To date, the direct adhesion forces of bacteria to mucins remain poorly investigated. The main limitation is the lack of a quantitative technique that can be used for an accurate evaluation of adhesion. With the introduction of atomic force microscopy (AFM),¹² it is now possible to probe real-life microbial interaction forces on the nanoscale. Contrary to pathogen-related works on interactions between fibronectin and *Staphylococcus aureus* or *S. epidermidis*,^{13,14} only a few studies have addressed the attachment of beneficial microorganisms (probiotics and technological microbiota), such as lactic acid bacteria (LAB), to protein-coated surfaces, especially on the molecular level. As part of ongoing efforts to provide quantitative information on bacteria/mucin interactions, the present work was devoted to the first AFM investigation of the adhesion force to the well-described pig gastric mucin (PGM) using *Lactococcus lactis* as a LAB model. *Lactococcus* strains are traditionally not considered to be natural inhabitants of the human gastrointestinal tract, even though their presence has sporadically been detected.^{15–17} Moreover, Giaouris et al.¹⁸ recently highlighted the diversity of surface physicochemical properties among 50 natural *L. lactis* strains isolated from different origins (dairy, vegetable, and animal), diversity that can afford an important pool of functionalities for food-related applications. Because *Lactococcus* strains are widely used as starter bacteria in manufacturing cheese and other fermented dairy products, establishing their adhesive properties toward mucins could contribute to the design of new functional foods.

To achieve the above aim, commercial PGM was adsorbed onto polystyrene. The significant difference in the adsorption mechanism of mucin, depending on the substrate surface chemistry, was previously reported, with a strong, irreversible hydrophobic interaction dominating the binding to hydrophobic surfaces compared to weaker, reversible electrostatic interactions taking place at hydrophilic surfaces.¹⁹ The PGM layer was characterized in terms of physicochemical surface properties from water contact angle measurements and chemical composition using X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). Moreover, AFM was performed using the HarmoniX mode²⁰ to gain further insight into the PGM layer formed on polystyrene. This operating mode21 enables us to evaluate precisely, at the same time and with a high spatial resolution, the topography, elastic modulus, dissipation, and adhesive properties of the sample.²² In the present work, the HarmoniX mode was used to discriminate the polystyrene substrate and the PGM layer on the basis of nanomechanical properties and adhesion forces. In parallel, an AFM bacterial probe was designed by immobilizing *L. lactis* cells on the tip. SEM images were recorded to check the cell distribution over the tip (base/sides of the pyramidal tip). The cell probe

technique was introduced in early 2000^{22–24} to quantify the adhesion between two aggregating cells or between a cell and a solid surface when analyzing force–distance data upon retraction of the cell probe from the surface. In further studies,^{13,25,26} the cell probe design, based on attaching bacteria to a poly-L-lysine-treated tip through electrostatic attraction, enabled the cell's native state to be preserved. In the present study, polyethylenimine (PEI) was chosen to create positive charges on the tip surface. The *L. lactis* bacterial probe was then used to probe, on the nanoscale, interactions with polystyrene before and after PGM adsorption. This was achieved through the classical force spectroscopy (FS) and force volume (FV) modes. To support AFM force spectroscopy results, the physicochemical characterization of the PGM coating described above was used.

Experimental Section

Bacterial Strain, Growth Conditions, and Preparation of Suspensions. *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* strain MG1820 was used throughout this study. Bacterial stock cultures were kept at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in M17 broth (Oxoid), containing 2% (w/v) lactose and 20% (v/v) glycerol. Bacteria were first subcultured at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ in a M17-lactose (2% (w/v)) medium. This preculture was then used to inoculate a 500 mL flask containing 100 mL of M17-lactose (2% (w/v)) broth, which was incubated overnight at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ until the early stationary phase was reached (optical density of 5.0 at a wavelength of 580 nm). Cells were harvested by centrifugation (4000 rpm, 10 min, room temperature) and washed twice with Milli-Q-grade water. The optical density of the suspension at 580 nm was then adjusted to 1.0 in Milli-Q-grade water, which approximately corresponded to 5×10^8 CFU/mL (determined by plating). This suspension was used to prepare the cell probe. After 6 h of storage in Milli-Q water, no loss of cell viability was observed (data not shown).

PGM-Layer Preparation and Characterization. The mucin starting material was commercially available as a lyophilized powder (Sigma M1778), which was prepared according to the method described by Glenister et al.²⁷ Partially purified type III mucin from porcine stomach, hereafter referred to as PGM (pig gastric mucin), was dissolved in pH 7.5 phosphate-buffered saline (PBS) to a final concentration of 10 mg/mL. Sterile Petri dishes, manufactured from crystal polystyrene (Greiner Bio-One SAS, Courtaboeuf, France), were cut into suitable pieces ($1 \times 1\text{ cm}^2$). Coupons were immersed in RBS 25 2% (v/v) liquid detergent (Traitements Chimiques de Surfaces, Frelinghien, France) at $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 min, rinsed in five successive baths of tap water at $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ and five successive baths of tap water at room temperature, rinsed with copious amounts of Milli-Q-grade water ($50\text{ }^{\circ}\text{C}$ and room temperature), and finally air dried for 15 min under a vertical flow hood (Cytosafe 2000, Faster, Italy). Surfaces were either used immediately in the following steps or stored in a desiccator at room temperature until use.

For the adsorption experiments, polystyrene (PS) substrates were prepared according to the above procedure and exposed overnight to a 10 mg/mL PGM solution in pH 7.5 PBS at room temperature under gentle agitation. After incubation, surfaces were copiously rinsed to remove loosely bound material using, in sequence, PBS and Milli-Q-grade water and dried with N_2 . PGM-coated substrates (PS + PGM) were subsequently observed with HMX cantilevers, in AFM HarmoniX mode, as described elsewhere.²⁰ Bare polystyrene (PS) was used as control. Surfaces

(12) Müller, D. J.; Krieg, M.; Alsteens, D.; Dufrene, Y. F. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2009**, *20*, 4.

(13) Xu, C.-P.; Boks, N. P.; de Vries, J.; Kaper, H. J.; Norde, W.; Busscher, H. J.; van der Mei, H. C. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 7522.

(14) Liu, Y.; Strauss, J.; Camesano, T. A. *Biomaterials* **2008**, *29*, 4374.

(15) Klijn, N.; Weerkamp, A. H.; De Vos, W. M. *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, *61*, 2771.

(16) Kimoto, H.; Kurisaki, J.; Tsuji, N. M.; Ohmono, S.; Okamoto, T. *Appl. Microbiol.* **1999**, *29*, 313.

(17) Vinderola, C. G.; Reinheimer, J. A. *Food Res. Int.* **2003**, *36*, 895.

(18) Giaouris, E.; Chapot-Chartier, M. P.; Briandet, R. *Int. J. Food Microbiol.* **2009**, *131*, 2.

(19) Feiler, A. A.; Sahlholm, A.; Sandberg, T.; Caldwell, K. D. *J. Colloid Interface Sci.* **2007**, *315*, 475.

(20) Pittenger, B.; Veeco, A. N. *112* **2009**.

(21) Sahin, O.; Quate, C. F.; Solgaard, O.; Atalar, A. *Phys. Rev. B* **2004**, *69*, 165416.

(22) Benoit, M.; Gabriel, D.; Gerisch, G.; Gaub, H. E. *Nat. Cell Biol.* **2000**, *2*, 313.

(23) Bowen, W. R.; Lovitt, R. W.; Wright, C. J. *Colloids Surf., A* **2000**, *173*, 205.

(24) Bowen, W. R.; Lovitt, R. W.; Wright, C. J. *J. Colloid Interface Sci.* **2001**, *237*, 54.

(25) Touhami, A.; Jericho, M. H.; Boyd, J. M.; Beveridge, T. J. *J. Bacteriol.* **2006**, *188*, 370.

(26) Mei, L.; Busscher, H. J.; van der Mei, H. C.; Chen, Y.; de Vries, J.; Ren, Y. *Eur. J. Oral Sci.* **2009**, *117*, 419.

(27) Glenister, D. A.; Salmonk, E.; Smith, K.; Beighton, D.; Keevil, C. W. *Microb. Ecol. Health Dis.* **1988**, *1*, 31.

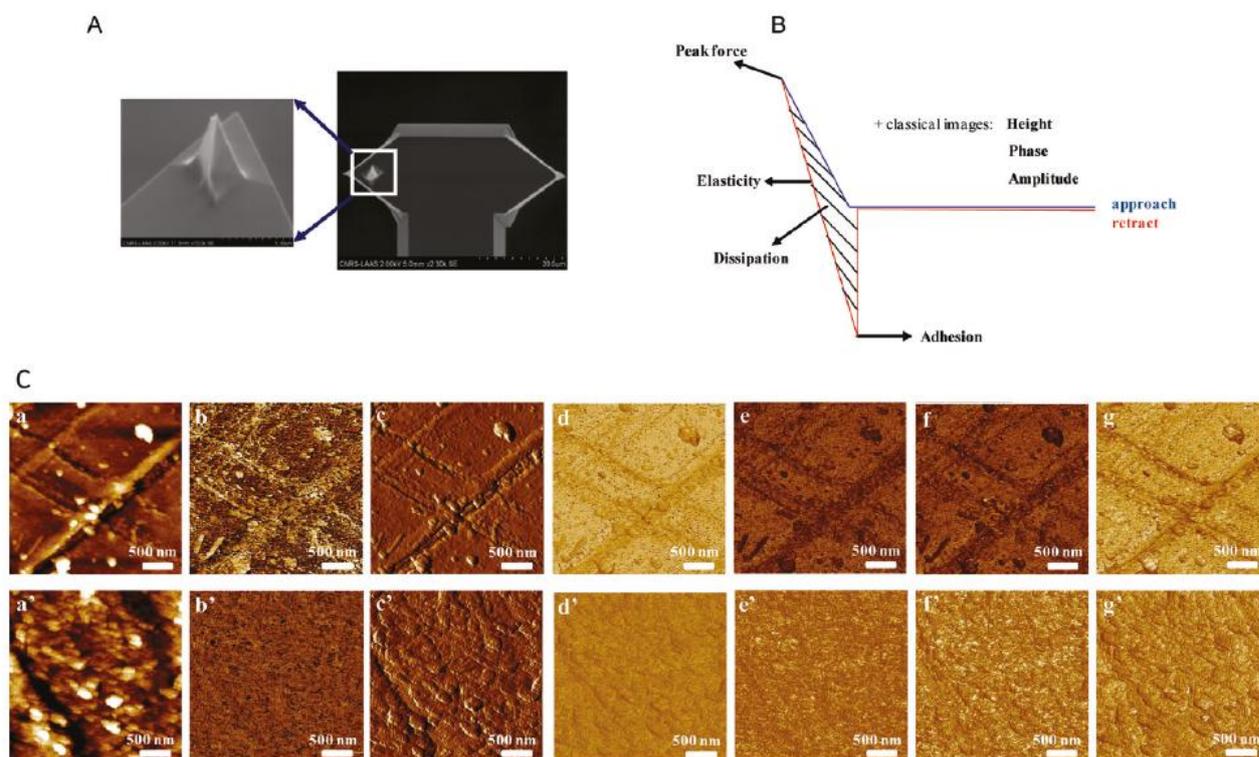


Figure 1. (A) SEM image of the HMX probe used in AFM in HarmoniX mode. (B) Schematic representation of data extracted from the continuously recorded force–distance curves in HarmoniX mode. (C) HarmoniX-AFM images of PS and PS + PGM: height (0–150 nm), amplitude, and phase (a–c and a'–c', respectively) and peak force (0–200 nN), dissipation (0–10 au), adhesion force (0–75 nN), and elasticity (0–7 GPa) (d–g and d'–g', respectively).

were then analyzed with respect to wettability using the sessile drop technique with a Digidrop goniometer (contact angle meter, GBX Scientific Instruments, Romans sur Isère, France), coupled with WinDrop⁺⁺ software to capture and analyze images. Each reported value is the average of at least three advancing deionized water contact angle measurements per sample. In parallel, the physicochemical properties of PS and PS + PGM surfaces were assessed on the atomic scale with X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) using a Thermo Electron Escalab 250 spectrometer equipped with a monochromated Al K α X-ray source ($h\nu = 1486.6$ eV, spot size = $500 \times 500 \mu\text{m}^2$). Survey spectra and high-resolution spectra were recorded at pass energies of 100 and 20 eV, respectively. The spectrometer was calibrated against the Au 4f_{7/2} binding energy (84.1 eV). The following core levels were analyzed: C 1s, O 1s, S 2p, and N 1s. The photoelectron takeoff angle between the surface and the direction in which the photoelectrons are analyzed was 90°. Curve fitting of the spectra was performed with Thermo Electron software Avantage.

Cell Probe Design and Characterization. For cell probe preparation, OTR4 (Si₃N₄) probes, purchased from Veeco Instruments SAS (Dourdan, France) were used. Cantilevers and tips were first cleaned for 15 min via UV/O₃ treatment. They were precoated with polyethylenimine (PEI) by immersion for 5 h in a PEI solution (0.1% (w/v) in Milli-Q-grade water), rinsed with a copious amount of Milli-Q-grade water, and stored under light vacuum. The negatively charged (data not shown) *L. lactis* cells, suspended in Milli-Q-grade water (OD_{580 nm} = 1), were attached to the positively charged PEI-coated probes by electrostatic attraction through a 20 min contact time. The cell probes, finally rinsed with Milli-Q-grade water, were ready for further experiments. The presence of immobilized bacteria on the AFM tip, before and after AFM measurements, was checked by scanning electron microscopy (SEM; Hitachi S-3700N). For SEM observations, the bacteria-coated probe was kept in a clean closed box and allowed to dry under ambient conditions.

Force Spectroscopy Using AFM. AFM experiments were performed at room temperature using the Bioscope II system from Veeco Process Equipment Inc. (Santa Barbara, CA). All measurements involving bacteria were conducted in Milli-Q-grade water to avoid any modification of the cell wall due to desiccation. Single force–distance curves and a matrix of 32×32 force–distance curves on $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ squares were recorded. The loading force was set to 1 nN for all experiments. Each substratum (PS vs PS + PGM) was first probed with a bare Si₃N₄ probe in order to set a baseline for comparing the force measurements with the biologically functionalized probe (lacto probe). The spring constants of the tips were measured for each probe and were in the range of 0.02–0.03 N/m. Adhesion forces, deduced from the force–distance curves, were quantified using Research Nanoscope 7.30R1 software from Veeco Instruments SAS and analyzed with Kruskal–Wallis one-way analysis of variance (ANOVA) on ranks test^{28,29} using Sigma stat 3.5.

Results and Discussion

Multiscale Analysis of the PGM Coating on Polystyrene. The PGM layer that formed on polystyrene (PS) was investigated by coupling different multiscale methods (AFM, XPS, and the sessile drop method). PGM-coated surfaces were first observed via HarmoniX-mode AFM using HMX cantilevers (Figure 1A). The inset scheme in Figure 1B is useful for explaining the significance of values extracted from the continuously recorded force–distance curves. Figure 1C depicts the adsorbed PGM layer (PS + PGM) (a'–g') compared to the bare polymer (PS) (a–g). The comparison of the “classical” height, amplitude, and phase images

(28) Kruskal, W. H.; Wallis, W. A. *J. Am. Stat. Assoc.* **1952**, *47*, 583.
 (29) Kruskal, W. H. *Ann. Math. Stat.* **1952**, *23*, 535.

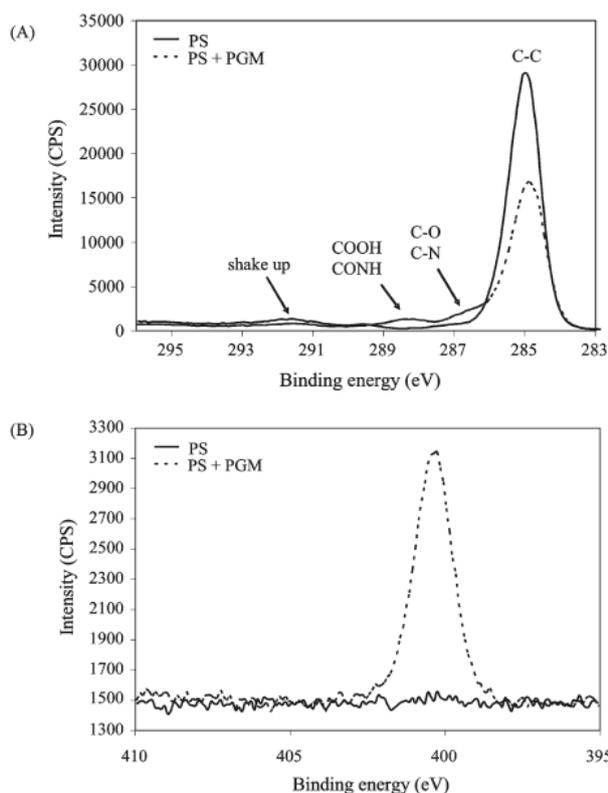


Figure 2. (A) C 1s core-level spectra and (B) N 1s core-level spectra recorded by XPS for PS and PS + PGM.

obtained for PS and PS + PGM with tapping (Figure 1Ca–c, and a'–c', respectively) clearly demonstrated the presence of a relatively homogeneous coating on the polymer surface. Figures 1C d–g and d'–g' present, before and after PGM adsorption, the variation of the peak force (i.e., the maximum force applied to the surface), the dissipation (i.e., the area between the approach and retraction curves), the adhesion, and the elasticity (derived from the retraction curve using the DMT model³⁰), respectively. Once again, differences due to PGM adsorption were undoubtedly observed. The PGM layer was more adhesive at the tip and dissipated more energy than did bare polystyrene (Figure 1Ce',f and e,f, respectively). Nevertheless, the elasticity was similar in both cases (Figures 1Cg' and g), probably because of the low thickness of the coating. (See below.)

In parallel, the surfaces of bare (PS) and PGM-coated polystyrene (PS + PGM) were characterized using X-ray photoelectron spectroscopy. Results are displayed in Figure 2A,B for C 1s and N 1s core-level spectra, respectively. For PS, the C 1s spectrum was fitted with two contributions. The first peak at 285.0 eV was associated to carbon in polystyrene and C–C bonds due to surface contamination. This peak includes the two C 1s components of polystyrene, cyclic CH₂, and aliphatic CH₂ at 284.8 and 285.0 eV, respectively. The second peak, attributed to the shakeup satellite (characteristic of polystyrene), was observed at 291.5 eV. After PGM adsorption, the intensities of the peaks at 285.0 and 291.5 eV decreased (Figure 2A). The attenuation of these signals was caused by the polystyrene surface coating. Two other C 1s contributions were also observed. The peak at 286.4 eV was

(30) Belikov, S.; Magonov, S.; Erina, N.; Huang, L.; Su, C.; Rice, A.; Meyer, C.; Prater, C.; Ginzburg, V.; Meyers, G.; McIntyre, R.; Lakrout, H. *J. Phys. Conf.* **2007**, *61*, 1303.

Table 1. Elemental Surface Composition (Content in Atom %) Determined by XPS for PS and PS + PGM

	C–C, C–H	C–O, C–N	COOH, CONH	N	O	S
PS	97.5				2.5	
PS + PGM	70.6	9.1	3.7	5.2	11.2	0.2

associated with C–O and/or C–N bonds whereas that at 288.4 eV was assigned to COOH or CONH compounds. These peaks are representative of chemical groups present in mucins (protein core and carbohydrate side chains). The N 1s signal, depicted in Figure 2B, was not detected for bare PS, as expected. After the PGM coating, it was composed of one peak at 400.4 eV (Figure 2B), associated with to NH₂ and characteristic of nitrogen in C–NH₂ groups of proteins. O 1s and S 2p signals (traces for the latter) were also observed at 532.7 and 164.1 eV (data not shown). Table 1 summarizes the elemental surface composition of PS and PS + PGM substrates. The presence, quantified in terms of atomic content for C–O, C–N, COOH, CONH, and sulfur-related species, was observed after PGM adsorption. All of these results confirmed the presence of adsorbed PGM at the polystyrene surface. Assuming a continuous layer of mucins, the corresponding thickness was deduced from the attenuation of the polystyrene shakeup satellite: a value of 3.4 nm was obtained, in agreement with previous literature data^{31,32} and in accordance with the range of most protein monolayer coatings. For instance, the thickness of an adsorbed BSA layer has previously been shown to reach ~4 nm.³³ The low thickness value was also consistent with AFM measurements. XPS results were then analyzed according to a previously described model,^{34,35} taking into account three basic biochemical components, namely, proteins (C_{Pr}), polysaccharides (C_{Po}), and hydrophobic compounds (C_{C–H}). Solving the following system of equations gives the percentage of carbon involved in proteins (%C_{Pr}), polysaccharides (%C_{Po}), and hydrophobic compounds (%C_{C–H}):

$$[N/C] = 0.279(C_{Pr}/C)$$

$$[O/C] = 0.325(C_{Pr}/C) + 0.833(C_{Po}/C)$$

$$1 = [C/C] = (C_{Pr}/C) + (C_{Po}/C) + (C_{C–H}/C)$$

As expected, modeling results gave 97% of C_{C–H} for bare polystyrene (in the model, the constitution of C_{C–H} is CH₂). Carbon in the PGM coating was distributed as 30% C_{Pr}, 12% C_{Po} and 58% C_{C–H}. The high proportion of hydrophobic compounds was explained by the thickness of the PGM layer (3.4 nm, which is lower than the XPS analysis depth of about 10 nm), reinforcing the contribution of the underlying polystyrene substrate. The estimated C_{Pr} and C_{Po} percentages were consistent with the glycoprotein-like mucin composition.

To link AFM and XPS nanoscale analysis to global surface properties such as hydrophilic/hydrophobic character, PS and

(31) Malmsten, M.; Blomberg, E.; Claesson, P.; Carlstedt, I.; Ljusegren, I. *J. Colloid Interface Sci.* **1992**, *151*, 579.

(32) Shi, L.; Ardehali, R.; Caldwell, K. D.; Valint, P. *Colloids Surf., B* **2000**, *17*, 229.

(33) Zanna, S.; Compère, C.; Marcus, P. In *Passivation of Metals and Semiconductors, and Properties of Thin Oxide Layers: A Selection of Papers from the 9th International Symposium*, Paris, France, 2006; Marcus, P., Maurice, V., Eds.; Elsevier: Amsterdam, p 357.

(34) Rouxhet, P. G.; Mozes, N.; Dengis, P. B.; Dufrière, Y. F.; Gerin, P. A.; Genet, M. *J. Colloids Surf., B* **1994**, *2*, 347.

(35) Dague, E.; Deloorte, A.; Latge, J. P.; Dufrière, Y. F. *Langmuir* **2008**, *24*, 2955.

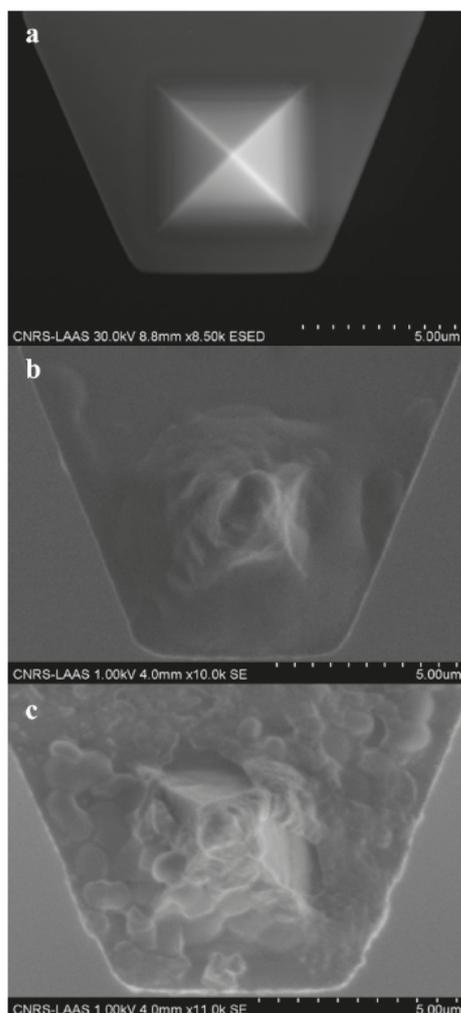


Figure 3. Representative SEM images of the lacto probe for *L. lactis* cells immobilized onto the AFM tip and cantilever. (a) Si_3N_4 AFM probe, (b) AFM probe after the preadsorption of PEI, and (c) a biologically functionalized AFM probe showing attached bacteria.

PS + PGM substrates were analyzed with respect to wettability. As expected for a hydrophobic polymer such as polystyrene, a water contact angle of $98.5 \pm 2.9^\circ$ was reached. After PGM adsorption, it dropped to $58.5^\circ \pm 5.7^\circ$, suggesting the formation of a very hydrophilic coating on polystyrene. This increased wettability, as already described in the literature,^{32,36} is probably due to the adsorption of segments of the mucin backbone via protein–polymer hydrophobic interactions, and the hydrophilic carbohydrate side chains are preferentially exposed to the surrounding aqueous medium.

Verification of the *L. lactis* Probe Using SEM. The potential of the AFM-based technique to quantify the *L. lactis*/PGM interaction force relies on the accuracy and reproducibility of making bacterial probes. A qualitative SEM-based method was thus applied to verify that the tip was successfully coated with *L. lactis* cells. Figure 3 presents SEM images at each step in the lacto probe creation process. Figure 3a depicts the Si_3N_4 probe just after UV/ O_3 cleaning, and Figure 3b represents the positively

charged probe after the preadsorption of PEI. Figure 3c, illustrating the final step, highlights the successful creation of the biological probe, consisting of *L. lactis* cells immobilized onto the AFM tip through electrostatic interactions. We should emphasize that, according to the PEI-based method, no drying step is required. The sensitivity of a single cell on the AFM tip could not be achieved, and clusters of cells were rather typically attached (Figure 3c), as previously depicted for the *S. epidermidis* biological probe.¹⁴ However, the reproducibility on the creation of clusters with a small grouping of bacteria on the tip was assessed. Moreover, at the conclusion of each experiment, the presence of bacteria on the AFM tip was checked using SEM (data not shown). Taking these results together, we can claim that interactions measured by AFM force spectroscopy are really those involved between *L. lactis* cells and PGM and not between the tip and PGM.

Interaction Forces between the Lacto Probe and PGM: Comparison with Bare Polystyrene. Corresponding results are synthesized in Figure 4. Histograms representing the different interaction force distributions (i.e., Si_3N_4 probe/PS, lacto probe/PS, Si_3N_4 probe/PS + PGM, lacto probe/PS + PGM) are displayed in Figure 4a,c,e,g, respectively. Illustrative schemes for each configuration tested are also included. Figure 4b,d,f,h highlights the typical force–distance curves recorded. Figure 5 is a more detailed alternative to histograms and presents the adhesion force repartition according to the substrate (PS/PS + PGM) and the probe (bare/biologically functionalized). The ANOVA on ranks analysis, performed on the basis of force intensity, enabled the four configurations to be discriminated ($p = 0.001$, $n = 1024$), showing that, after PGM adsorption, force levels were lower. For example, the adhesion forces of the lacto probe to PS and PS + PGM were 0.74 ± 0.10 and 0.12 ± 0.06 nN, respectively. These antiadhesive properties of mucin coatings, previously demonstrated for *S. aureus* and *S. epidermidis*,³² are due to the interplay of electrostatic, hydrophilic, and steric repulsions induced by PGM structural and interfacial complexity.

The shape of the force–distance curves is an important point to be discussed. The profile, observed for bare polystyrene in Figures 4b and 4d, is typical of nonspecific interactions, including hydrophobic, electrostatic and van der Waals forces.^{37,38} Moreover, almost all force–distance exhibited the same profile. In contrast, after PGM adsorption, three different typical shapes were observed (Figure 4f,h): (i) no adhesive event, detected when retracting the tip from the PGM-coated surface (for instance, 43% for the lacto probe, see Figure 4g), (ii) nonspecific adhesive events, similar to those depicted for PS, and (iii) specific one, two, or three adhesive events, occurring several nanometers after the contact point. The particular shape of group iii retraction force curves could be due to multiple contact sites of bacteria and/or stretching of the PGM molecules. We should note that it is difficult to discriminate force–distance curves from groups ii and iii on the sole basis of force intensity (Figure 4f,h). These profiles are consistent with the contribution of both nonspecific and specific forces (ligand/receptor bonding) to the bacterial adhesion process when protein-coated surfaces are involved, for example, with fibronectin.^{13,14} This interplay of specific and nonspecific interactions with mucins is, for the first time, described by AFM force spectroscopy. The simplistic view of mucins as passive, water-holding barrier components now has to evolve in order to include highly specific processes where mucins play a

(37) Dague, E.; Alsteens, D.; Latge, J. P.; Verbelen, C.; Raze, D.; Baulard, A. R.; Dufrene, Y. F. *Nano Lett.* **2007**, *7*, 3026.

(38) Alsteens, D.; Dague, E.; Rouxhet, P. G.; Baulard, A. R.; Dufrene, Y. F. *Langmuir* **2007**, *23*, 11977.

(36) Sandberg, T.; Blom, H.; Caldwell, K. D. *J. Biomed. Mat. Res. Part A* **2008**, *91A*, 762.

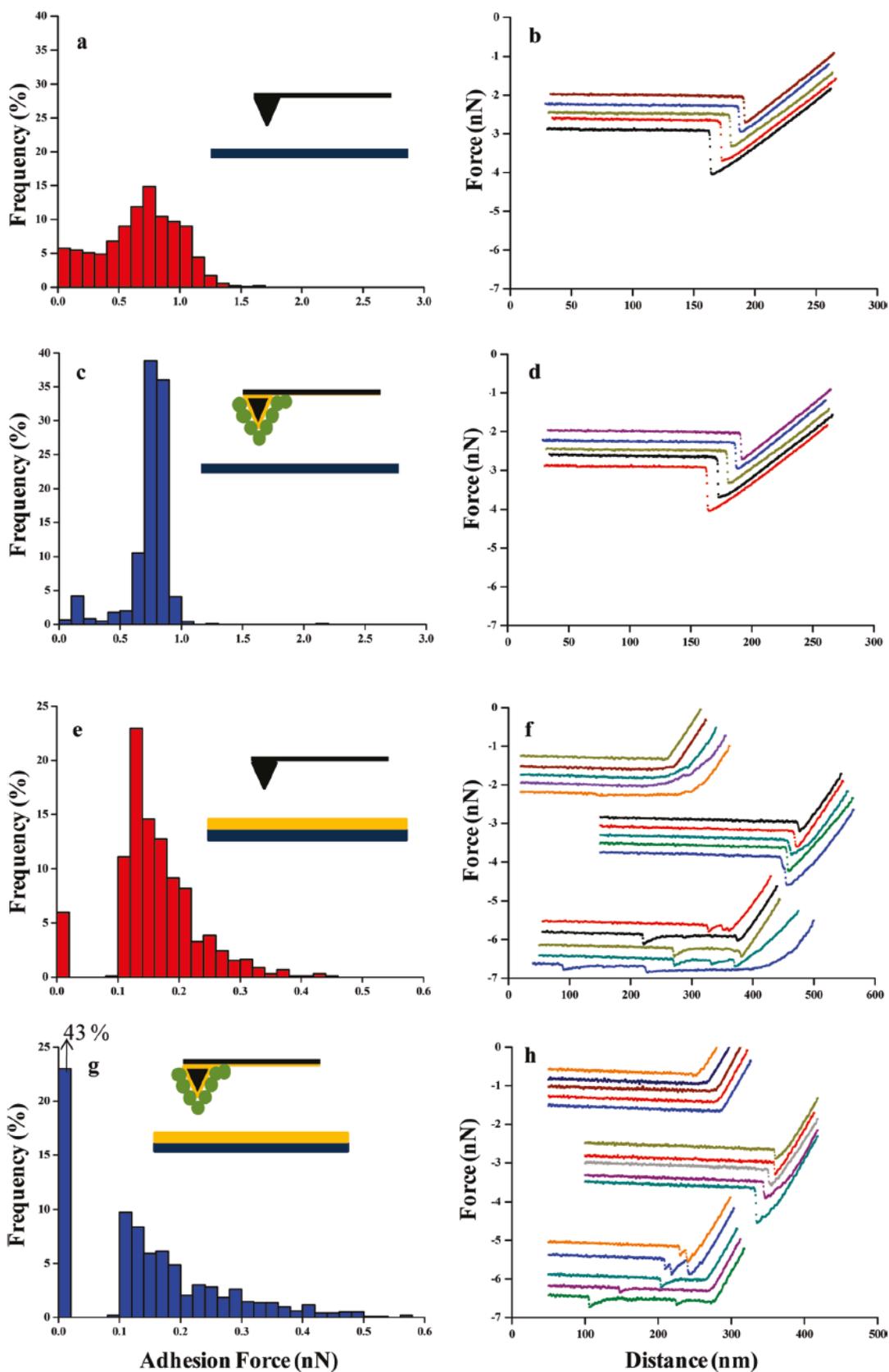


Figure 4. Histograms representing the adhesion forces for (a) Si₃N₄ probe/PS, (c) lacto probe/PS, (e) Si₃N₄ probe/PS + PGM, and (g) lacto probe/PS + PGM. Some examples of typical force–distance curves are presented in b, d, f, and h in the same order.

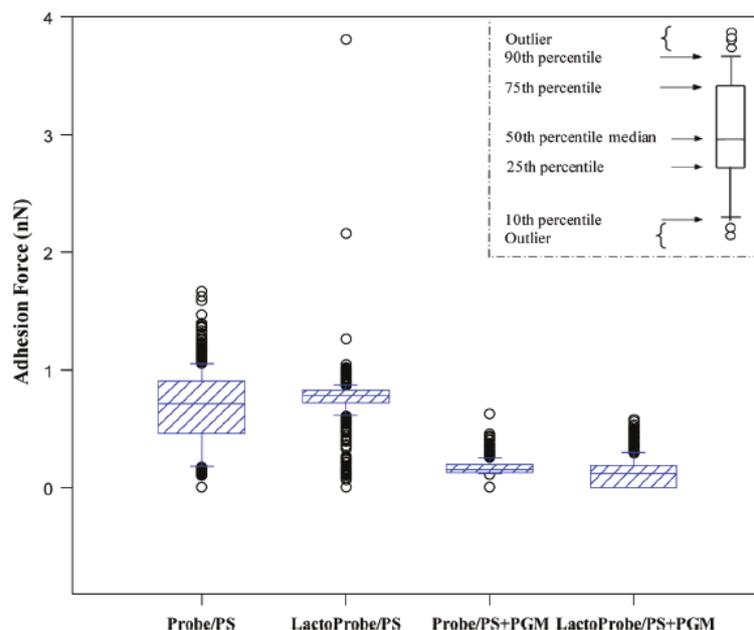


Figure 5. Statistical analysis of the adhesion force values obtained for the Si_3N_4 probe and the lacto probe after adhesion to PS and PS + PGM. The inset in the top right corner explains the representation of the repartitions.

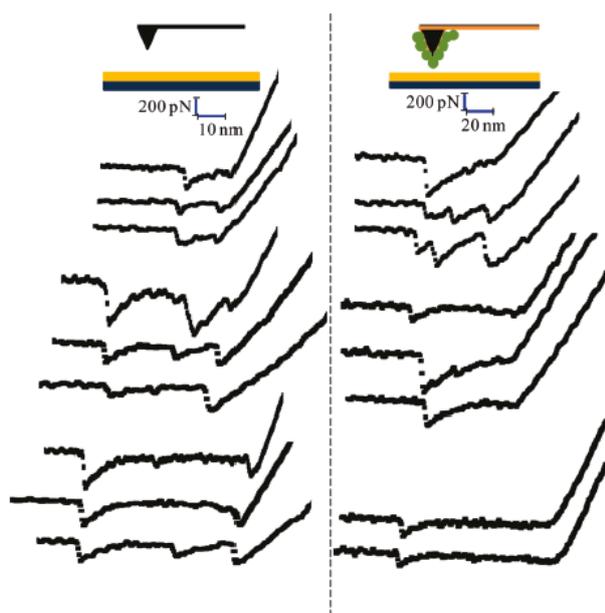


Figure 6. Typical retraction force–distance curves recorded between the Si_3N_4 probe and PS + PGM (left) and the lacto probe and PS + PGM (right).

central, active role. Extracellular proteins with domains predicted to be involved in adherence to mucus have recently been described for lactic acid bacteria.³⁹ These mucus-binding domains (MUB), found exclusively in LAB, are variable in size (100–200 residues per domain) and number (1–15 for a given protein). Among different LAB species (lactobacilli/lactococci), MUB-domain-containing proteins are most abundant in lactobacilli, which are the natural inhabitants of the gastrointestinal tract.³⁹ The MUB

(39) Boekhorst, J.; Helmer, Q.; Kleerebezem, M.; Siezen, R. J. *Microbiology* 2006, 152, 273.

domain is undoubtedly a specific functional unit, fulfilling an important role in host–microbe interactions in the gastrointestinal tract (persistence, competitive exclusion of pathogens, and other health-stimulatory interactions). Figure 6 shows some representative typical length ruptures for group iii retraction curves, obtained with the Si_3N_4 probe and the lacto probe interacting with PS + PGM. The specific adhesive events can be explained by the preferred orientation of PGM carbohydrates side chains on the extreme surface. For the Si_3N_4 tip, group iii represents 6% of the total number of curves recorded and the rupture lengths are 30 (30), 45 (30), 100 (19), 160 (13), 260 (5), and 400 nm (3%). For the lacto probe, group iii represents only 9% of the total curve number, with the following rupture length repartition: 30 (51), 45 (39), and 100 nm (10%). To explain this low percentage of specific adhesive events for the *L. lactis* strain under study (MG1820), we should mention that in “domesticated” *L. lactis* strains that live in a more restricted habitat than do the lactobacilli of the gastrointestinal tract, the presence of only a single MUB-domain-containing protein has been reported.³⁹ For MG1363, a parental strain of MG1820, the putative corresponding protein (lmg_2465) contains only three MUB domains of 100 amino acids each. Moreover, the absence of a signal peptide, generally required to target the protein to the bacterial cell wall, is probably an indication of the nonfunctionality of lmg_2465.

Conclusions

The use of AFM force spectroscopy, in conjunction with a complementary set of multiscale analytical methods (XPS and the sessile drop method), yielded new insights into the interaction mechanisms between adsorbed mucins (PGM) and *L. lactis*, chosen as the model for lactic acid bacteria. The present work aimed, for the first time, to quantify directly on the nanoscale and compare the adhesion forces between an *L. lactis*-functionalized AFM tip (lacto probe) and bare/PGM-coated polystyrene. The presence of the PGM coating strongly reduced the bacterial adhesion force with respect to the bare substrate, which is in line

with the protective function generally ascribed to the mucus layer. Both nonspecific and specific forces (ligand/receptor bonding) were shown to be involved in *L. lactis* adhesion to mucins. The simplistic view of mucins as passive, water-holding barrier components has now evolved to include highly specific processes where such complex biomolecules play a central and active role. The lacto probe concept and the associated AFM measurements, which have not yet been described in the literature, may now provide a powerful framework for understanding the mucin/*L. lactis* interaction mechanisms through the identification of mucin oligosaccharides and bacterial adhesins involved by

exploiting the diversity of surface and interfacial properties of natural/recombinant *L. lactis* strains.

Acknowledgment. We gratefully acknowledge the PEPS INRA/CNRS-INST2I research program (2008-2010) for funding. We thank Marie-Pierre Duviols (LISBP, Toulouse, France) and Franck Carcenac (LAAS-CNRS, Toulouse, France) for technical support. E.D. is a researcher at the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). D.T.L.L. is a Ph.D. student funded by the Institut National de Recherche Agronomique (INRA). E.D. is hosted in Centre Pierre Potier ITAV, UMS 3039.

1.3. Détermination des constantes cinétiques associées aux interactions spécifiques entre *L. lactis* et la mucine PGM

Measuring kinetic dissociation/association constants between *Lactococcus lactis* bacteria and mucins using living cell probes

Objectif : cette étude vise à une meilleure compréhension des mécanismes d'interaction entre la souche naturelle *L. lactis* ssp. *cremoris* IBB477 et la couche de PGM (tests de blocage, constantes cinétiques d'association et de dissociation), en tirant profit des potentialités de la technique AFM, démontrées dans le chapitre précédent sur la souche de référence MG1820.

Matériels et méthodes : la viabilité des bactéries après immobilisation sur la pointe AFM a été estimée avec un marqueur fluorescent (diacétate de carboxyfluorescéine-CFDA). Pour vérifier la spécificité des interactions mises en évidence entre la lacto-pointe et PGM, nous avons effectué, chez les souches MG1820 et IBB477, des expériences de blocage avec PGM, puis uniquement avec sa partie O-glycannique (S-PGM). A cette fin, avant les essais AFM proprement dits, la lacto-pointe est incubée dans la solution de PGM ou de S-PGM (10 mg/mL). Nous avons enfin exploré par AFM la dynamique des interactions moléculaires du complexe *L. lactis*/PGM en faisant varier la vitesse au retrait et le temps de contact, pour accéder aux constantes cinétiques de dissociation (K_{off}) et d'association (K_{on}), respectivement.

Résultats : nous avons vérifié le maintien de la viabilité des lactocoques, une fois immobilisés sur la pointe AFM. Nous avons, par ailleurs, établi les différences des propriétés bio-adhésives des souches MG1820 et IBB477 vis-à-vis de PS et PS+PGM. Les résultats obtenus montrent que la force d'adhésion à la couche de PGM est plus élevée pour IBB477, probablement en lien avec la persistance observée *in vivo* pour cette souche sur modèle murin. Les tests de blocage démontrent que la partie oligosaccharidique de PGM joue un rôle, certes, important mais non exclusif dans le processus d'interaction entre IBB477 et PGM. Enfin, en accédant aux paramètres cinétiques caractéristiques (K_{on} , K_{off}), nous avons pu mieux caractériser les mécanismes d'interaction entre *L. lactis* et PGM. A l'heure actuelle, il n'existe aucune donnée dans la littérature relative aux constantes cinétiques, spécifiques des interactions entre les bactéries et les mucines. Néanmoins, la valeur de K_{off} estimée ici pour IBB477 ($0,46 \text{ s}^{-1}$) est du même ordre de grandeur que celles rapportées pour les complexes sucres/protéines. Ceci renforce l'idée d'une interaction préférentielle entre la partie

oligosaccharidique de PGM et *L. lactis*, via une adhésine de la surface bactérienne (protéine(s) à domaines MUB, autre(s) adhésine(s)...) qu'il conviendra maintenant d'identifier.

Measuring Kinetic Dissociation/Association Constants Between *Lactococcus lactis* Bacteria and Mucins Using Living Cell Probes

Doan Thanh Lam Le,^{†‡§¶||**} Yann Guérardel,^{§§††} Pascal Loubière,^{†‡§} Muriel Mercier-Bonin,^{†‡§*} and Etienne Dague^{¶||***}

[†]INSA, UPS, INP, Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, [‡]INRA, UMR792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, [§]Centre National de la Recherche Scientifique, UMR5504, [¶]Centre National de la Recherche Scientifique, LAAS, ^{||}Centre National de la Recherche Scientifique, ITAV-UMS3039, and ^{**}UPS, INSA, INP, ISAE, UT1, UTM, LAAS, ITAV, Université de Toulouse, Toulouse, France; and ^{††}Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 8576 and ^{§§}Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Université de Lille 1, Villeneuve d'Ascq, France

ABSTRACT In this work we focused on quantifying adhesion between *Lactococcus lactis*, the model for lactic acid bacteria (LAB) and mucins. Interactions between two strains of *L. lactis* (IBB477 and MG1820 as control) and pig gastric mucin-based coating were measured and compared with the use of atomic force microscopy. Analysis of retraction force-distance curves shed light on the differential contributions of nonspecific and specific forces. An increased proportion of specific adhesive events was obtained for IBB477 (20% vs. 5% for the control). Blocking assays with free pig gastric mucin and its O-glycan moiety showed that oligosaccharides play a major (but not exclusive) role in *L. lactis*-mucins interactions. Specific interactions were analyzed in terms of kinetic constants. An increase in the loading rate of atomic force microscope tip led to a higher force between interacting biological entities, which was directly linked to the kinetic dissociation constant (K_{off}). Enhancing the contact time between the tip and the sample allowed an increase in the interaction probability, which can be related to the kinetic association constant (K_{on}). Variations in the loading rate and contact time enabled us to determine K_{on} ($3.3 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) and K_{off} (0.46 s^{-1}), and the latter was consistent with values given in the literature for sugar-protein interactions.

INTRODUCTION

Understanding the adhesion processes that occur between a microorganism and a surface is definitely a sticky problem (1). Microbial adhesion occurs in both industrial and health domains. On the one hand, it causes harmful side effects, including food spoilage, spread of foodborne diseases, biofouling of materials, and hospital-acquired infections. On the other hand, in parallel with increasing efforts to eradicate uncontrolled biocontamination, it may be useful to promote the adhesion of friendly microorganisms such as probiotic lactic acid bacteria (LAB). Probiotics are living, nonpathogenic microorganisms that when administered in adequate amounts confer a health benefit to the host (2–4). To display such properties in vivo, probiotics need to survive at sufficiently high levels and colonize the gastrointestinal tract. A prerequisite for colonization is adhesion to epithelial mucosa, which is thus generally considered as one of the major criteria for probiotic selection.

Another useful target involving bacterial adhesion is the development of live vaccines. Mucosal routes for vaccine delivery offer several advantages over systemic inoculation, such as reduction of secondary effects, easy administration, and the possibility to modulate both systemic and mucosal immune responses (5). Moreover, it is important for medical molecules that exert their effects at mucosal surfaces to be directly delivered to the appropriate site. Unfortunately,

the immunogenicity of soluble proteins is low when administered at the mucosal level. When used as a carrier system, living bacteria can substantially help to overcome such drawbacks, provided that they are able to colonize and multiply in the host without causing disease. The use of living bacterial vectors derived from pathogenic microorganisms such as *Mycobacterium*, *Salmonella*, and *Bordetella* spp. is not totally safe for older people, children, and immunosuppressed patients (6). Therefore, numerous LAB species that meet the Generally Recognized as Safe criteria of the Food and Drug Administration may be suitable for active delivery of therapeutic proteins by genetically modified microorganisms (7).

As part of ongoing efforts to obtain quantitative information about LAB-mucosa interactions in the gastrointestinal tract, we sought to characterize at the nanoscale the adhesion of *Lactococcus lactis* to intestinal mucus, with a special focus on mucins. *L. lactis* is widely used as a starter in manufacturing cheese and other fermented dairy products. It is not usually considered a normal element of the human intestinal microbiota, even though it has been sporadically isolated from the feces of many different groups of humans (8). Indeed, an in silico analysis by Boekhorst et al. (9) highlighted the presence of mucus-binding (MUB) domain-containing proteins in lactococci. Furthermore, the biodiversity of a large panel of natural *L. lactis* strains in terms of surface physicochemical properties (10) and potentially mucoadhesive behavior may provide an important pool of functionalities for food- and health-related applications.

Submitted July 28, 2011, and accepted for publication October 12, 2011.

*Correspondence: Muriel.Mercier-Bonin@insa-toulouse.fr or edague@laas.fr

Editor: Daniel Mueller.

© 2011 by the Biophysical Society
0006-3495/11/12/2843/11 \$2.00

doi: 10.1016/j.bpj.2011.10.034

Mucins are heavily O-glycosylated proteins that are found in the mucus layer at the surface of many epithelia (11). They are responsible for the physical properties of mucus gels and are involved in numerous interactions between cells and their environment. Alterations in mucin expression or glycosylation are observed during the development of cancers and influence cellular growth, differentiation, transformation, adhesion, invasion, and immune surveillance (12). Mucins (e.g., MUC1, MUC4, and MUC16) have also been identified as markers of adverse prognosis and thus constitute attractive therapeutic targets (13). In this framework, there is a great interest in analyzing bacterial mucoadhesive properties to aid in the selection of probiotic candidates (14) and improve drug-delivery strategies (15).

The surface determinants that mediate adhesion of LAB to mucus are MUB proteins (9), S-layer (16–18), and other specific proteins (16,19,20). One of the subunits of a proteinaceous surface-exposed polymeric structure known as pili (SpaC) was recently identified in *Lactobacillus rhamnosus* GG and shown to mediate adhesion to human intestinal mucus (21). Of note, this mechanism was previously established in many Gram-positive pathogens (22). Furthermore, nonproteinaceous compounds have been suggested to play a role in mucosal adhesion. For instance, teichoic or lipoteichoic acids were shown to be involved in adhesion of *L. johnsonii* (23) or *L. reuteri* (24) to Caco-2 cells. The role of exopolysaccharides produced by *L. rhamnosus* GG was also pointed out (25).

In contrast to pathogens, few studies have addressed the attachment of beneficial microorganisms such as *L. lactis* to mucus-like models, especially at the molecular level. In this context, atomic force microscopy (AFM) and optical or magnetic tweezers (26,27) have emerged as powerful tools for probing single-scale molecular events. They can be used to measure single-molecule interactions between receptors and ligands (28,29), such as antibodies and antigens (30), enzymes and substrates (31), biotin and streptavidin (32), and lectins and carbohydrates (33). Particular attention has also been paid to interactions between a virus and its host cell (34), and between vancomycin and the bacterial cell wall (peptidoglycan) (35). To this end, the target biomolecule was bound to the atomic force microscope tip and the single-molecule-based interactions between the modified tip and the biomimetic surface were measured. For a review of studies conducted on living cells, see Dufrière (36). In this work, building on our previous results regarding the relevance of the lacto-probe concept for probing *L. lactis*/pig gastric mucin (PGM) interactions (37), we attached living lactococci to the atomic force microscope tip to obtain a better understanding of bacterial mucoadhesion from a mechanistic point of view. To that end, we measured and compared interactions between two different strains of *L. lactis* (IBB477 and MG1820 as control) and PGM-based coating at the single-molecule level. We

performed blocking assays with free PGM and its constituting O-glycans to elucidate the respective roles of the protein and the oligosaccharide moieties of mucins. Moreover, by varying the loading rate and contact time during dynamic force spectroscopy experiments, we were able to determine, with living cell probes, the kinetic constants (association and dissociation) of the biological interactions between *L. lactis* and mucins.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strain, growth conditions, and preparation of suspensions

Throughout this study, we used *L. lactis* subsp. *cremoris* strains IBB477 and MG1820. IBB477 was originally isolated from samples of Polish artisanal dairy products (38). Bacterial stock cultures were kept at -80°C in M17 broth (Oxoid) containing 2% (w/v) lactose and 20% (v/v) glycerol. Bacteria were first subcultured at 30°C in M17-lactose (2% (w/v)) medium. This preculture was then used to inoculate a 500 mL flask containing 100 mL of M17-lactose (2% (w/v)) broth, which was incubated overnight at 30°C until the early stationary phase was reached (optical density of 5.0 at a wavelength of 580 nm). Cells were harvested by centrifugation (4000 rpm, 10 min, and room temperature) and washed twice with MilliQ-grade water. The optical density of the suspension at 580 nm was then adjusted to 1.0 in MilliQ-grade water, which approximately corresponded to 5.10^8 CFU/mL (determined by plating). Suspensions of both IBB477 and MG1820 strains were used to prepare the cell probe.

PGM layer preparation and characterization

The mucin starting material was commercially available as a lyophilized powder (M1778; Sigma, St. Louis, MO). Partially purified type III mucin from porcine stomach (PGM) was dissolved in phosphate-buffered saline (PBS) at pH 7.5 at a final concentration of 10 mg/mL. Coupons of polystyrene were prepared for PGM adsorption as described in our previous work (37), with slight modifications. In brief, polystyrene substrates made from sterile petri dishes (Greiner Bio-One SAS) were incubated overnight with PGM solution at 4°C under gentle agitation. After incubation, the surfaces were rinsed to remove loosely bound material with (in sequence) PBS and MilliQ-grade water, and then dried with N_2 . PGM-coated polystyrene was subsequently characterized by an AFM scratch test. An area ($3 \times 3 \mu\text{m}^2$) was first recorded at high forces (10 nN), and a larger image ($10 \times 10 \mu\text{m}^2$) was then imaged under normal load (1 nN).

Cell probe design and characterization

OTR4 (Si₃N₄) probes, purchased from Veeco Instruments SAS, were used to prepare the cell probes as described elsewhere (37). Cantilevers and tips were first cleaned for 15 min via UV/O₃ treatment. They were precoated with polyethylenimine (PEI) by immersion for 5 h in a PEI solution (0.2% (w/v) in Milli-Q-grade water), rinsed with a copious amount of Milli-Q-grade water, and stored under light vacuum. *L. lactis* cells suspended in MilliQ-grade water (OD_{580 nm} = 1) were then attached to the positively charged, PEI-precoated probes during a 20-min contact time. The cell probes were finally rinsed with Milli-Q-grade water and were then ready for further experiments. After fabricating the cell probes and performing AFM measurements, we checked for the presence of immobilized bacteria on the AFM tip by scanning electron microscopy (SEM; Hitachi S-3700N). In addition, we evaluated the viability of bacteria after immobilization on the PEI-coated surface. To that end, we first observed the lacto-probe under bright-field microscopy to visualize the total amount

of immobilized cells. Then, the lacto-probe was incubated with carboxy-fluorescein diacetate (5(6)-CFDA: 5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate-mixed isomers, C195, 492–517 nm; Molecular Probes) for 45 min at 30°C, and reexamined under epifluorescence microscopy. In this method, cells that exhibit an esterase activity are seen in green. Control experiments were performed with dead cells after heat inactivation, and, as expected, no green fluorescence was detected (data not shown).

Force spectroscopy using AFM

We performed AFM experiments at room temperature using the Nanoscope II from JPK Instruments (Berlin, Germany) and the Bioscope II from Veeco Instruments (Santa Barbara, CA). All measurements involving *L. lactis* were conducted in milliQ-grade water to avoid any modification of the cell wall due to desiccation. Single force-distance curves and a matrix of 32×32 force-distance curves on $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ squares were recorded, giving 1024 force curves to be analyzed for each experiment. We probed the PGM-coated surface with the lacto-probe to compare the adhesion force between the two strains of *L. lactis* (IBB477 and MG1820). The spring constants of the tips were measured for each probe by the thermal-tune method and were in the range of 0.01–0.02 N.m^{-1} . Unless otherwise specified, all force measurements were recorded with a loading rate of $96,000 \text{ pN.s}^{-1}$ and a contact time of 0 s. We calculated the loading rate by multiplying the spring constant of the cantilever by its retraction velocity. We then adjusted it for related experiments by controlling the cantilever velocity. For measurements dedicated to the determination of kinetic constants (K_{on} and K_{off}), the loading rate and contact time were varied in the range of 8000–160,000 pN.s^{-1} and 0–10 s, respectively. To calculate K_{on} , we took only force curves that presented biological interactions into account (i.e., considering multiple adhesion events and excluding any nonspecific events). The adhesion rate calculated corresponds to the number of force curves that presented at least one interaction event at several nanometers after the contact point (specific events) over the total number of force curves recorded. Blocking assays were performed with free PGM (10 mg/mL in PBS) and O-glycans (10 mg/mL in PBS). The O-glycans were prepared as follows: PGM was submitted to reductive β -elimination for 72 h at 37°C in 100 mM NaOH containing 1 M NaBH_4 . The reaction was stopped by the addition of Dowex (Sigma-Aldrich) 50×8 (25–50 mesh, H^+ form) at 4°C until pH 6.5. After filtration on glass wool and evaporation to dryness, boric acid was eliminated by repetitive distillation as its methyl ester in the presence of methanol. The material was submitted to a cationic exchange chromatography on Dowex (Sigma-Aldrich) 50×2 (200–400 mesh, H^+ form) to remove residual peptides. Sugar-containing fractions were purified on a Bio-Gel P2 column ($150 \times 2.5 \text{ cm}$; Bio-Rad).

AFM experiments were performed in triplicate with independent PGM-coated surfaces and lacto-probes. We quantified the adhesion forces, as deduced from the force-distance curves, using SPM Image Processing v.03 software from JPK Instruments AG, and Research Nanoscope 7.30R1 software from Veeco Instruments SAS.

RESULTS AND DISCUSSION

In this work we used AFM force spectroscopy to quantify at the molecular scale interactions between PGM model mucin, adsorbed on bare polystyrene, and two strains of *L. lactis* (the control strain MG1820, depicted in terms of in vitro mucoadhesion in our previous work (37), and the IBB477 strain, which exhibited efficient persistence in the rat gastrointestinal tract when tested in vivo (38)). We applied the lacto-probe concept and associated AFM measurements (37) to probe, discriminate, and elucidate the mucoadhesive properties of both strains, and to explore the dynamics of *L. lactis*-PGM biological interactions.

Characterizing the lacto-probe and the PGM-coated surface

Fig. 1 shows SEM images obtained at each step of the lacto-probe creation process. The Si_3N_4 tip (Fig. 1 A) was first covered with the polycation PEI. The positively charged tip (Fig. 1 B) was then incubated with *L. lactis* cells, which were shown to be negatively charged (data not shown). The same procedure was applied to create lacto-probes with MG1820 and IBB477 strains (Fig. 1, C and D, respectively). Regardless of the strain involved, the sensitivity of a single cell on the AFM tip could not be achieved, and clusters of cells were rather typically attached, as previously depicted (37). However, the immobilization efficiency was identical for both strains, probably due to the same surface charge (data not shown). We carried out additional experiments to check the viability of the bacteria once they were immobilized on the PEI-coated surface. To that end, we first

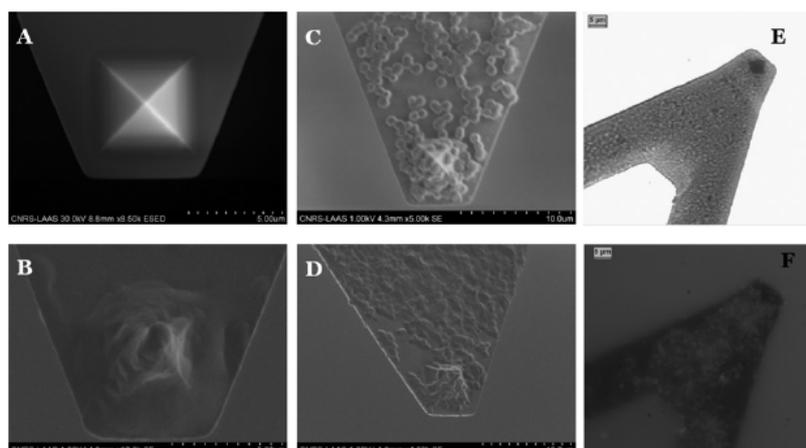


FIGURE 1 Representative SEM and epifluorescence images of the biologically functionalized AFM probe, for *L. lactis* cells immobilized onto AFM tip and cantilever. (A) Si_3N_4 AFM probe. (B) AFM probe after preadsorption of PEI. (C and D) Lacto-probe of MG1820 and IBB477, respectively. (E) Bright-field microscopy image of the MG1820 lacto-probe (total bacteria). (F) Epifluorescence image of the MG1820 lacto-probe after CFDA staining.

observed the lacto-probe under bright-field microscopy to visualize the total amount of cells (Fig. 1 *E*). The lacto-probe was then incubated with CFDA and reexamined under epifluorescence microscopy. Cells that exhibit an esterase activity appear bright and can be considered as physiologically active. Fig. 1 *F* clearly shows that the *L. lactis* bacteria on the probe were viable, or at least esterase active. Furthermore, after each AFM experiment, we checked the persistence of bacteria on the AFM tip by SEM (data not shown).

We previously depicted the PGM layer formed on bare polystyrene using different multiscale methods (e.g., AFM, x-ray photoelectron spectroscopy (XPS), and the sessile drop method) (37). XPS-based modeling enabled us to estimate a layer thickness of 3.4 nm. To experimentally validate this value, we carried out AFM scratch tests with a bare atomic force microscope tip (Fig. 2). Using this procedure, we removed the PGM layer and revealed the underlying polystyrene surface (arrow in Fig. 2 *C*). The thickness of the PGM layer, as deduced from such measurements, was 3.15 nm, which is nearly identical to the predicted value of 3.4 nm.

Measuring the interaction force of *L. lactis*-PGM: comparison of the IBB477 and MG1820 strains

Force-distance curves were recorded at a loading rate of $96,000 \text{ pN}\cdot\text{s}^{-1}$ between the lacto-probe and the PGM-based coating. Fig. 3 shows a comparison of the AFM results for the MG1820 and IBB477 strains. Adhesion maps are illustrated in Fig. 3, *A* and *B*, respectively. Histograms representing the different interaction force distributions (i.e., MG1820 lacto-probe/PGM coating, and IBB477 lacto-probe/PGM coating) are displayed in Fig. 3, *C* and *D*, respectively. Illustrative schemes for each configuration tested are also included. Fig. 3, *E* and *F*, highlight typical recorded retraction force-distance curves. As previously reported (37), adhesion of *L. lactis* to PGM was characterized by the combination of three representative curve shapes: 1), no adhesive event detected upon retraction of the tip from the PGM-coated surface; 2), nonspecific adhesive events (showing no extension before rupture); and 3), one, two, or three specific adhesive events occurring at several nanometers after the contact point. We define these specific interactions as biological ones involving ligand-receptor bonding (e.g., antibody-antigen interactions), which are different from nonspecific physicochemical interactions (e.g., hydrophobic, electrostatic, or Lifshitz-van der Waals interactions). Here, the particular shape of group-3 retraction force curves could be due to multiple contact sites of bacteria and/or stretching of the PGM molecules. Therefore, we performed a thorough analysis of such force-distance curves for each strain by focusing on the respective roles of nonadhesive events, and nonspecific and specific adhesive events. For the MG1820 strain, 45% of the force curves corresponded to nonadhesive events, and 50% of the force

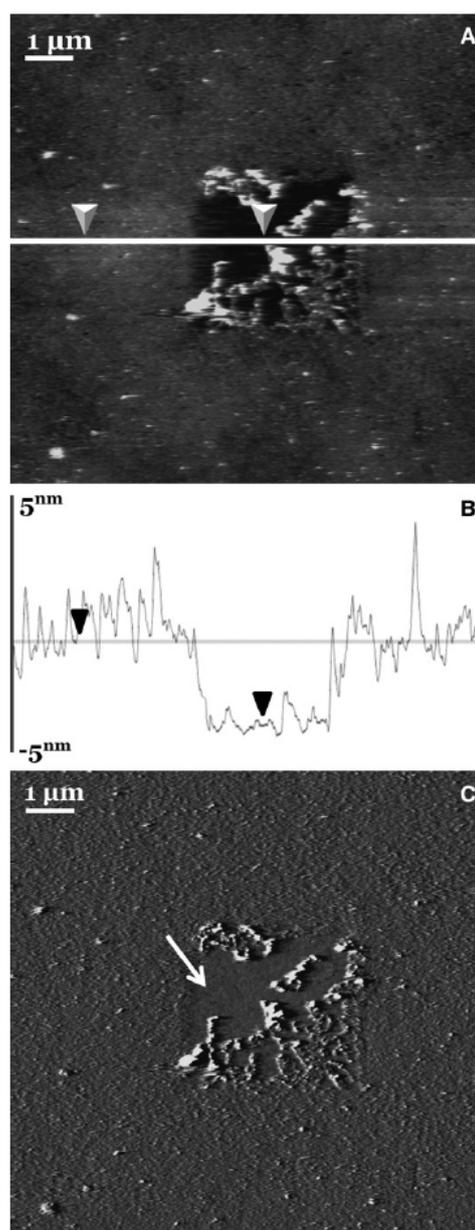


FIGURE 2 AFM height (*A*) and deflection (*C*) images of the PGM layer formed on polystyrene. (*B*) Scratch test on a cross section.

curves were characteristic of nonspecific physicochemical interactions (including hydrophobic, electrostatic, and van der Waals forces). Only 5% of the force curves were assigned to specific adhesive events. Such force repartition was consistent with previously published data (37). In contrast, for the IBB477 strain, almost all force curves (99%) corresponded to adhesive events and 20% of the force curves could be assigned to specific biological interactions. As a result, the adhesion force of the IBB477 strain to PGM was significantly higher than the value obtained for the

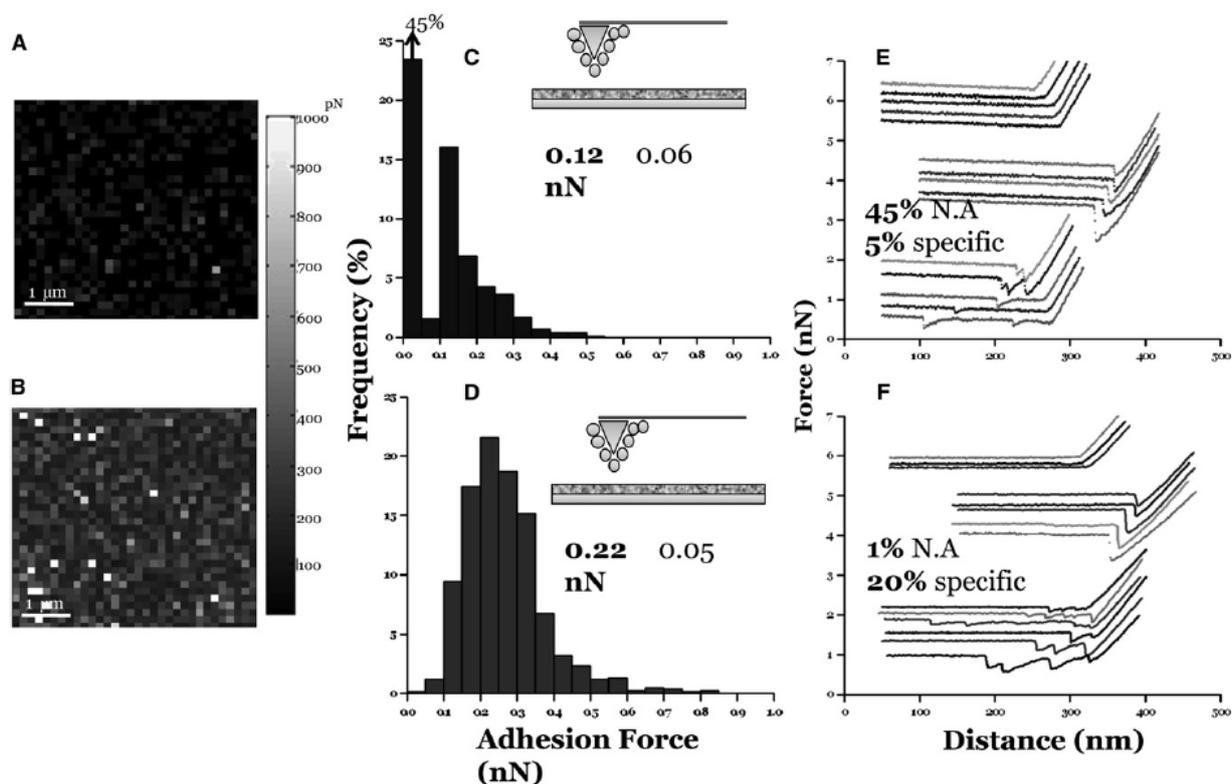


FIGURE 3 (A and B) Adhesion maps. (C and D) Histograms representing the adhesion forces. (E and F) Typical force-distance curves presented for (A, C, and E) the MG1820 lacto-probe after contact with the PGM-coated surface, and (B, D, and F) the IBB477 lacto-probe after contact with the PGM-coated surface.

MG1820 control (0.22 ± 0.05 nN vs. 0.12 ± 0.06 nN), which is consistent with the in vivo persistence of such a strain in the rat gastrointestinal tract (38).

Elucidating the respective roles of protein and oligosaccharide moieties of PGM in the interaction with *L. lactis*

To gain a more thorough understanding of the specificity of the interaction events observed for IBB477 and to a lesser extent MG1820, we carried out additional blocking experiments with free PGM and its sole O-glycans (S-PGM) to elucidate the respective roles of protein and oligosaccharide moieties of PGM. To that end, we incubated the lacto-probe in PGM or S-PGM solutions before putting it in contact with the PGM-based coating. We speculated that potential binding sites on the bacteria surface were saturated, with an efficiency correlated to their affinity toward PGM or S-PGM, and thus were no longer able to react with the PGM layer (see Fig. 4 A). For the MG1820 and IBB477 strains, preincubation of the lacto-probe with PGM dramatically reduced the number of curves that showed adhesive events, as well as the measured binding forces, indicating that the adhesion forces measured with the lacto-probe

were specific to the *L. lactis*-PGM interaction. Indeed, the percentage of nonadhesive events drastically increased, from 45% to 81% for MG1820 (Fig. 4 B) and from 1% to 81% for IBB477 (Fig. 4 C). Inhibition of adhesion was lower, albeit significant, with S-PGM for both strains. For MG1820, the nonadhesive event percentage increased from 45% to 71% (Fig. 4 B), whereas for IBB477 it only reached 48% (Fig. 4 C). On the basis of these results, we postulate that O-glycans in PGM plays a major (but not exclusive) role in mucin interactions with *L. lactis*. Some additional interactions probably occurred between the PGM protein core and other components of the cell surface, such as the polysaccharide pellicle, as recently described for lactococci (39).

Exploring the dynamics of *L. lactis*-PGM interactions

Finally, we sought to elucidate the dynamics of the biological interactions between *L. lactis* and PGM by determining the kinetic dissociation/association constants (K_{off} and K_{on}) by varying the AFM parameters (e.g., loading rate and contact time) during dynamic force spectroscopy experiments. Because of its specificity to PGM (20% specific

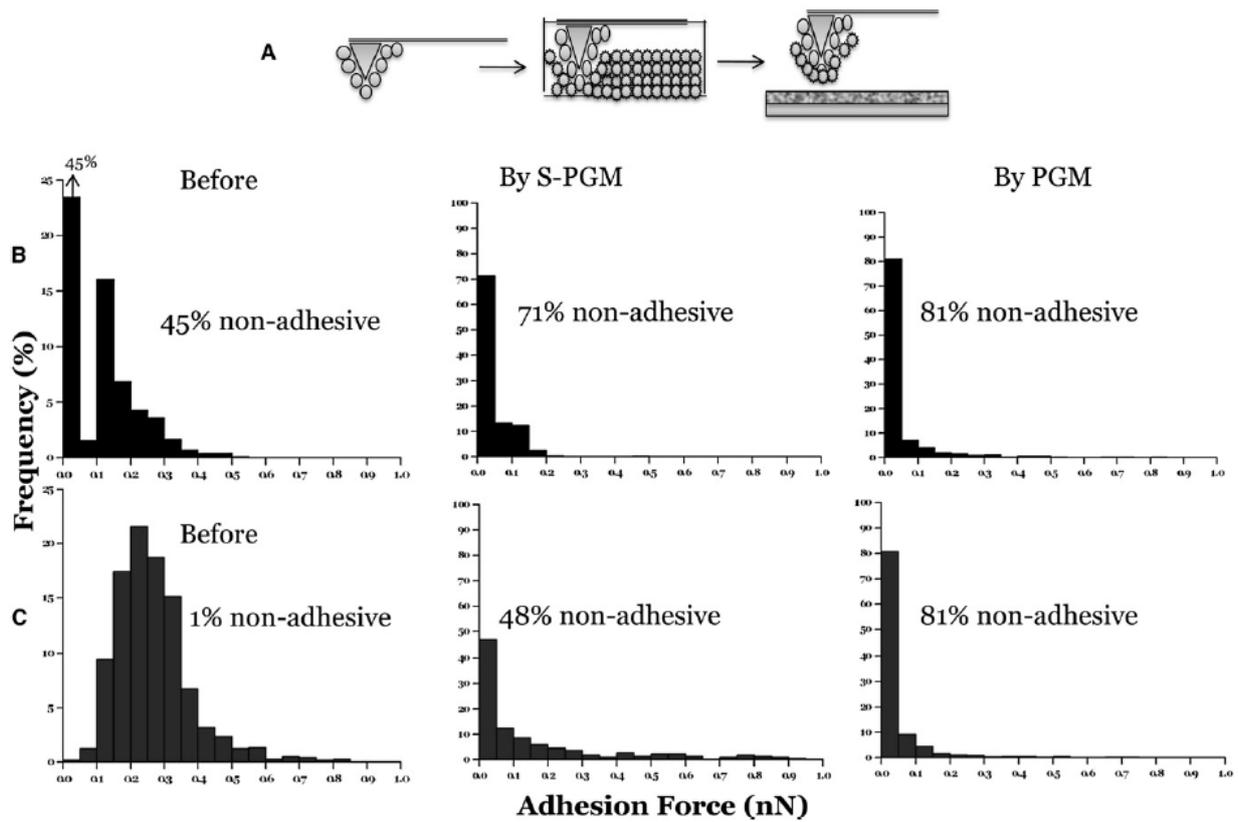


FIGURE 4 (A) Schematic representation of the AFM blocking test with free PGM or S-PGM. (B and C) Histograms of interaction forces before and after incubation of the lacto-probe with S-PGM and PGM solutions for (B) MG1820 and (C) IBB477.

adhesive events versus 5% for the control strain), we performed these experiments on the IBB477 strain (for determination of both kinetic constants). However, the association kinetic constant (K_{on}) was also evaluated for MG1820 (see below).

The unbinding force for a specific biological bond is expected to be a function of the loading rate (40; also see (44)).

In other words, the faster the tip is retracted, the higher will be the interaction force. The loading-rate dependence comes from the covalent link that exists in what we call biological interactions. Electrostatic, hydrophobic, van der Waals interactions are noncovalent and therefore are not expected to be influenced by the loading rate (41). Fig. 5 displays, for the IBB477 strain, the variation of the adhesion force

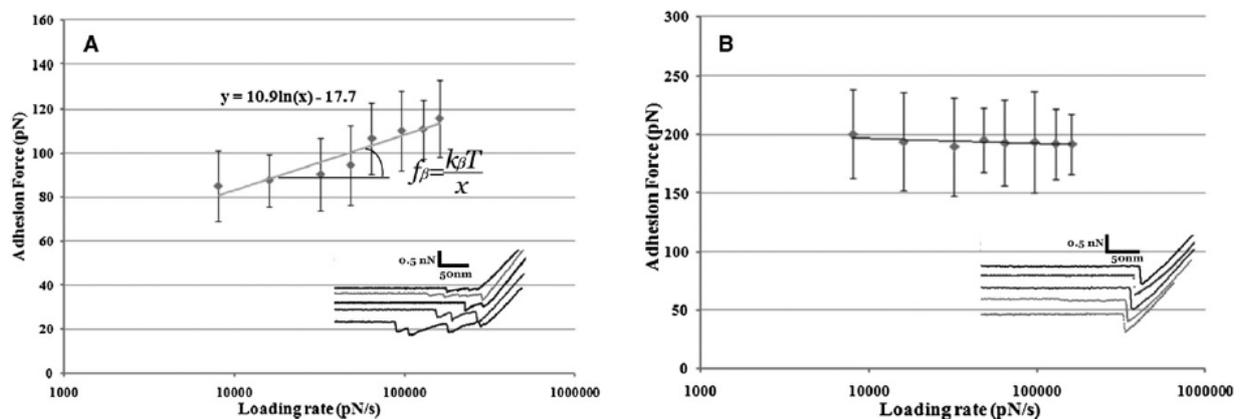


FIGURE 5 Loading-rate dependence of specific (A) and nonspecific (B) interaction forces between *L. lactis* and PGM, for IBB477.

with the loading rate ranging from 8000 to 160,000 pN.s⁻¹, taking into account both specific and nonspecific contributions (Fig. 5, A and B, respectively). For specific biological interactions, the direct relation between the adhesion force and the applied loading rate is clearly highlighted, with an increase from 85 ± 16 pN at 8000 pN.s⁻¹ to 116 ± 17 pN at 160,000 pN.s⁻¹ (Fig. 5 A). In contrast, as expected, when nonspecific interactions were considered, the adhesion force did not substantially depend on the loading rate applied during retraction, over the experimentally accessible range (Fig. 5 B).

Based on these results, we estimated the kinetic dissociation constant (K_{off}) of the *L. lactis*-PGM bond, for the IBB477 strain, according to the following equation (40):

$$F = f_{\beta} \times \ln\left(\frac{r}{f_{\beta}K_{off}}\right), \quad (1)$$

where F is the measured adhesion force; f_{β} is defined as the ratio between the thermal energy scale ($k_B T$, where k_B is Boltzmann's constant and T is temperature) and x , which is the length of the bond at the transition state; and r corresponds to the loading rate.

Equation 1 can be rewritten as follows:

$$K_{off} = \frac{r_0}{f_{\beta}}, \quad (2)$$

where r_0 corresponds to the loading rate at zero force.

The values f_{β} (slope) and r_0 (loading rate at zero force) were deduced from data presented in Fig. 5 A and reached 10.9 J.m⁻¹ and 5.0 pN.s⁻¹, respectively. The K_{off} parameter, estimated using Eq. 2, was equal to 0.46 s⁻¹.

In parallel, we studied the variation of the adhesion probability (derived from specific interaction forces) with the contact time between the lacto-probe and the PGM layer for IBB477 while keeping the loading rate constant (96,000 pN.s⁻¹). Data for the control MG1820 are also reported. As expected, the adhesion probability increased with contact time (Fig. 6). For MG1820, it rose from 6% to 17% for a contact time in the range of 0–4 s and then reached a plateau. A similar profile was observed for IBB477 (Fig. 6). The adhesion probability first increased from 17% to 32% and tended to level off after a contact time of 4 s. The dependence of the adhesion probability on the contact time indicates that the *L. lactis*/PGM complex formed via multiple intermolecular bonds. Indeed, the increase in contact time favors the formation of multiple bonds (42) and promotes larger contact surfaces through the viscoelastic adaptation of the cell shape to the interacting surface and the strengthening of active bonds by the cell (43). Moreover, regardless of the contact time, the percentage values remained higher than observed for MG1820, reinforcing our conclusions about the improved mucoadhesive ability of the IBB477 strain. However, we should note that it was not possible to reach a 100% rate of adhesive events.

On the basis of these results, we roughly estimated the kinetic association constant (K_{on}) between *L. lactis* and PGM for both MG1820 and IBB477 strains according to the following equation (44):

$$K_{on} = t_{0.5}^{-1} \times C_{eff}^{-1}, \quad (3)$$

where $t_{0.5}$ is the contact time needed to reach 50% of adhesive events, and C_{eff} corresponds to the effective concentration (M).

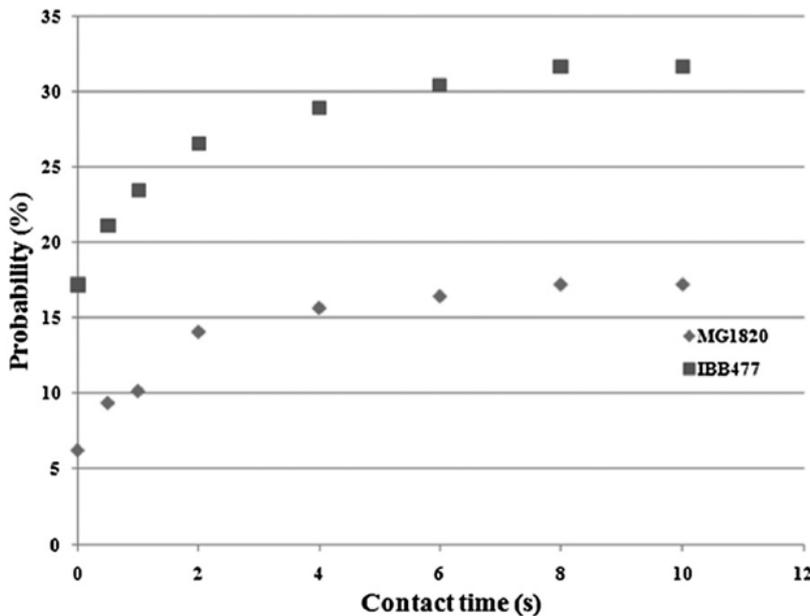


FIGURE 6 Contact-time dependence of the adhesion probability for MG1820 (◆) and IBB477 (■).

As depicted above, it was not possible to reach a 100% rate of adhesive events. As a consequence, the contact time needed to obtain 50% of adhesive events ($t_{0.5}$) could not be determined. Instead, we considered the duration required for the half-maximal probability of binding (1.37 s for both strains). In parallel, we deduced the effective concentration from the following equation (45):

$$C_{eff} = n \times N_A^{-1} \times V_{eff}^{-1}, \quad (4)$$

where n is defined as the number of binding partners within the effective volume V_{eff} accessible for free equilibrium interaction, and N_A is the Avogadro number.

To evaluate the effective volume V_{eff} , we defined a semi-ellipsoid (disk shape) assuming a polar radius corresponding to the thickness of the PGM layer (3.15 nm; see above) and an equatorial radius equal to the AFM tip radius (15 nm). Because two peaks were generally observed on force curves corresponding to specific adhesive events (Fig. 3), a number of two binding partners was assumed ($n = 2$). Under these conditions, the K_{on} parameter was estimated at $3.3 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ for both the IBB477 and MG1820 strains. Nevertheless, it should be noted that numerous assumptions had to be formulated, leading to some speculation about the predicted values, which should be considered with caution.

We used dynamic force spectroscopy to determine, for the first time to our knowledge, the kinetic constants

(K_{off} and K_{on}) of the biological interactions between *L. lactis* and PGM by varying the AFM parameters (i.e., the loading rate and contact time). Table 1 shows values of K_{off} and K_{on} reported in the literature, derived from AFM force spectroscopy, surface plasmon resonance (SPR), and parallel plate flow-chamber experiments. The large dispersion of both K_{off} and K_{on} values is impressive, probably due to the different methods used to probe the interactions (see, for example, differences in K_{off} for the same interaction as revealed by AFM and SPR (see (50)). First, few K_{on} values are available, and they range from 5.6×10^{-4} for concanavalin A/carboxypeptidase Y (45) to 4.4×10^6 for P-selectin/P-selectin glycoprotein ligand (47). Our K_{on} parameter ($3.3 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$), which was identical for the MG1820 and IBB477 strains, is thus hardly comparable with the literature values. A large variability was also observed for the kinetic dissociation constant (K_{off}). The lowest K_{off} values were in the range of 10^{-6} – 10^{-5} s^{-1} , corresponding to interactions between E-cadherin/E-cadherin (48) or streptavidin/biotin (49). Our K_{off} parameter (0.46 s^{-1}) was of the same order of magnitude as values obtained by Dettmann et al. (50) and Sletmoen et al. (51) using AFM on sugar-protein interactions. This reinforces our conclusions about *L. lactis*-PGM interactions, mainly mediated by O-glycans of PGM and proteinaceous-surface-exposed structures of *L. lactis*.

TABLE 1 Dissociation (K_{off}) and association (K_{on}) kinetic constants of different ligand-receptor complexes as found in the literature

Molecular partners	$K_{off} (\text{s}^{-1})$	$K_{on} (\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1})$	Methods
Human serum albumin (HSA)/anti-HAS	6.7×10^{-4}	5×10^4	AFM (30)
Streptavidin/biotin	1.67×10^{-5}	-	AFM (49)
Streptavidin mutant/biotin	10^{-2}	-	AFM (54)
	30	-	AFM (49)
	6.7×10^{-3}	-	-
	1.05	-	-
Concanavalin A (conA)/carboxypeptidase Y	0.17	5.6×10^{-4}	AFM (46)
VE-cadherin/VE-cadherin	1.8	10^4	AFM (44)
E-cadherin/E-cadherin	0.01	-	AFM (48)
	10^{-6} – 10^{-5}	-	-
Lysin motif (LysM)/peptidoglycan	0.15	2.4×10^3	AFM (55)
Lactose/bovine heart lectin (BHL)	$0.09/0.5 \times 10^{-3}$	-	AFM/SPR (50)
Lactose/lactose-binding immunoglobulin G (IgG)	$0.9/1.3 \times 10^{-3}$	-	-
Lactose/ <i>Viscum album</i> agglutinin (VAA)	$0.09/1.1 \times 10^{-3}$	-	-
Lactose/ <i>Ricinus communis</i> agglutinin (RCA)	$0.8/1.1 \times 10^{-3}$	-	-
N-glycan chains of Asialofetuin (ASF)/BHL	$1.3/1.1 \times 10^{-3}$	-	-
ASF/VAA	$0.9/1.3 \times 10^{-3}$	-	-
ASF/IgG	$1.6/0.5 \times 10^{-3}$	-	-
ASF/RCA	$0.4/1.2 \times 10^{-3}$	-	-
P-selectin/P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1)	1.4	4.4×10^6	SPR (47)
Mucin-like sialoglycoprotein termed peripheral node addressin (PNAd) /	-	-	Parallel plate flow chamber (56)
P-selectin	0.93	-	-
L-selectin	0.7	-	-
E-selectin	6.8	-	-
O-glycosylation domain of porcine submaxillary mucin possessing only α -GalNAc residues (Tn-PSM)/soybean agglutinin (SBA)	0.76	-	AFM (51)

CONCLUDING REMARKS

Extracellular proteins with domains predicted to be involved in adhesion to mucus have been described for LAB (9). These MUB domains, which are found exclusively in LAB, are variable in size (100–200 residues per domain) and number (one to 15 for a given protein). Among different LAB species (lactobacilli/lactococci), MUB domain-containing proteins are most abundant in lactobacilli, which are the natural inhabitants of the gastrointestinal tract (9). The MUB domain is undoubtedly a specific functional unit that plays an important role in host-bacteria interactions in the gastrointestinal tract (e.g., persistence, competitive exclusion of pathogens, and other health-stimulatory interactions). In addition, a subunit of the proteinaceous surface-exposed polymeric structure known as pili (SpaC) was identified in *L. rhamnosus* GG and shown to mediate adhesion to human intestinal mucus (21). Hypothetical pili formation and function(s) in *L. lactis* were recently addressed (identification of a putative class C sortase through in silico analysis) (52).

To explain the low percentage of specific adhesive events for the control strain MG1820 (5%), we should mention that in traditional, domesticated *L. lactis* strains, which live in a more restricted habitat than lactobacilli of the gastrointestinal tract, the presence of only one single MUB-domain-containing protein has been reported (9). However, Giaouris et al. (10) highlighted the diversity of surface physicochemical properties among 50 natural *L. lactis* strains isolated from different origins (dairy, vegetal, and animal). In the same way, Passerini et al. (53) recently observed genetic and genomic diversity within a collection of 36 strains (*L. lactis* subsp. *lactis*) isolated from different ecological sources and geographical areas. The authors proposed a new classification based on ecological separation between domesticated and environmental strains, the latter being the main contributors to genetic diversity within the subspecies. Such diversity may provide an important pool of phenotypic functionalities, probably including mucoadhesion. In this framework, the identification of molecular determinants involved in the in vitro/in vivo mucoadhesive ability of the IBB477 strain (e.g., MUB domain-containing protein(s) and hypothetical pili) would be highly valuable.

In conclusion, by using AFM force spectroscopy on two different strains of *L. lactis* (IBB477, which was previously shown to exhibit in vivo persistence in the rat gastrointestinal tract, and the control strain MG1820), we were able to gain new (to our knowledge) insights into the interaction mechanisms between *L. lactis* and PGM. We directly quantified at the nanoscale interaction forces between an AFM tip functionalized with living *L. lactis* cells (lacto-probe) and PGM-coated polystyrene. Both nonspecific (showing no extension before rupture) and specific forces (ligand-receptor bonding) were shown to be involved in *L. lactis* adhesion to PGM. A higher percentage of specific adhesive

events was observed for IBB477 (20%) compared with the control strain (5%), probably in line with its in vivo persistence. Blocking assays with free PGM and O-glycans showed that oligosaccharides play a major (but not exclusive) role in interactions between *L. lactis* and PGM. Moreover, we characterized the biological interactions, for the first time (to our knowledge) with living cell probes on mucins, in terms of both kinetic dissociation and association constants (K_{off} and K_{on}). Varying the loading rate and the contact time allowed us to estimate K_{off} and K_{on} , respectively. For both strains, the K_{on} value was identical ($3.3 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). The K_{off} parameter, which was only evaluated for IBB477, was equal to 0.46 s^{-1} , which is consistent with literature data reported for sugar-protein interactions. This reinforces our conclusions about *L. lactis*-PGM interactions, mainly mediated by O-glycans of PGM and proteinaceous-surface-exposed structures of *L. lactis*. Our findings regarding bacterial mucoadhesion may have broad implications for medical and food-related applications, notably by aiding in the selection of probiotic candidates and defining improved drug-delivery strategies.

We thank Jacek Bardowski and Magdalena Kowalczyk (Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland) for the gift of the IBB477 strain and for stimulating discussions. We also thank Marie-Pierre Duviau (Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, Toulouse, France) for her technical support.

This work was supported by the Caractérisation et Elaboration des Produits issus de l'Agriculture and Microbiologie et Chaîne Alimentaire departments of the Institut National de la Recherche Agronomique through a doctoral grant to D.T.L. Le (2008-2011).

REFERENCES

- Lewin, R. 1984. Microbial adhesion is a sticky problem. *Science*. 224:375–377.
- Kau, A. L., P. P. Ahern, ..., J. I. Gordon. 2011. Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature*. 474:327–336.
- Salminen, S., C. Bouley, ..., I. Rowland. 1998. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br. J. Nutr.* 80 (Suppl 1): S147–S171.
- Schrezenmeir, J., and M. de Vrese. 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73 (2, Suppl):361S–364S.
- Neutra, M. R., and P. A. Kozlowski. 2006. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat. Rev. Immunol.* 6:148–158.
- Alexandersen, S. 1996. Advantages and disadvantages of using live vaccines risks and control measures. *Acta Vet. Scand. Suppl.* 90:89–100.
- Wells, J. M., and A. Mercenier. 2008. Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 6:349–362.
- Finegold, S. M., V. L. Sutter, and G. E. Mathisen. 1983. Normal Indigenous Intestinal Flora. Academic Press, New York.
- Boekhorst, J., Q. Helmer, ..., R. J. Siezen. 2006. Comparative analysis of proteins with a mucus-binding domain found exclusively in lactic acid bacteria. *Microbiology*. 152:273–280.
- Giaouris, E., M.-P. Chapot-Chartier, and R. Briandet. 2009. Surface physicochemical analysis of natural *Lactococcus lactis* strains reveals

- the existence of hydrophobic and low charged strains with altered adhesive properties. *Int. J. Food Microbiol.* 131:2–9.
11. Bansil, R., and B. S. Turner. 2006. Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 11:164–170.
 12. Hollingsworth, M. A., and B. J. Swanson. 2004. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat. Rev. Cancer.* 4:45–60.
 13. Kufe, D. W. 2009. Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nat. Rev. Cancer.* 9:874–885.
 14. Tuomola, E., R. Crittenden, ..., S. Salminen. 2001. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *Am. J. Clin. Nutr.* 73(2, Suppl):393S–398S.
 15. Rathbone, M. J. 1993. *Oral Mucosal Drug Delivery.* Marcel Dekker, New York.
 16. Buck, B. L., E. Altermann, ..., T. R. Klaenhammer. 2005. Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:8344–8351.
 17. de Leeuw, E., X. Li, and W. Lu. 2006. Binding characteristics of the *Lactobacillus brevis* ATCC 8287 surface layer to extracellular matrix proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* 260:210–215.
 18. Johnson-Henry, K. C., K. E. Hagen, ..., P. M. Sherman. 2007. Surface-layer protein extracts from *Lactobacillus helveticus* inhibit enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adhesion to epithelial cells. *Cell. Microbiol.* 9:356–367.
 19. Miyoshi, Y., S. Okada, ..., E. Satoh. 2006. A mucus adhesion promoting protein, MapA, mediates the attachment of *Lactobacillus reuteri* to Caco-2 human intestinal epithelial cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70:1622–1628.
 20. Granato, D., G. E. Bergonzelli, ..., I. E. Corthésy-Theulaz. 2004. Cell surface-associated elongation factor Tu mediates the attachment of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucins. *Infect. Immun.* 72:2160–2169.
 21. Kankainen, M., L. Paulin, ..., W. M. de Vos. 2009. Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human-mucus binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106:17193–17198.
 22. Mandlik, A., A. Swierczynski, ..., H. Ton-That. 2008. Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development. *Trends Microbiol.* 16:33–40.
 23. Granato, D., F. Perotti, ..., 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.* 65:1071–1077.
 24. Walter, J., D. M. Loach, ..., G. W. Tannock. 2007. D-alanyl ester depletion of teichoic acids in *Lactobacillus reuteri* 100-23 results in impaired colonization of the mouse gastrointestinal tract. *Environ. Microbiol.* 9:1750–1760.
 25. Ruas-Madiedo, P., M. Gueimonde, ..., S. Salminen. 2006. Exopolysaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to human intestinal mucus. *J. Food Prot.* 69:2011–2015.
 26. Neuman, K. C., and A. Nagy. 2008. Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy. *Nat. Methods.* 5:491–505.
 27. Walter, N. G., C.-Y. Huang, ..., M. A. Sobhy. 2008. Do-it-yourself guide: how to use the modern single-molecule toolkit. *Nat. Methods.* 5:475–489.
 28. Florin, E. L., V. T. Moy, and H. E. Gaub. 1994. Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs. *Science.* 264:415–417.
 29. Hinterdorfer, P., and Y. F. Dufre ne. 2006. Detection and localization of single molecular recognition events using atomic force microscopy. *Nat. Methods.* 3:347–355.
 30. Hinterdorfer, P., W. Baumgartner, ..., H. Schindler. 1996. Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:3477–3481.
 31. Berquand, A., N. Xia, ..., Y. F. Dufre ne. 2005. Antigen binding forces of single antilysozyme Fv fragments explored by atomic force microscopy. *Langmuir.* 21:5517–5523.
 32. Lee, G. U., D. A. Kidwell, and R. J. Colton. 1994. Sensing discrete streptavidin-biotin interactions with atomic force microscopy. *Langmuir.* 10:354–357.
 33. Touhami, A., B. Hoffmann, ..., Y. F. Dufre ne. 2003. Aggregation of yeast cells: direct measurement of discrete lectin-carbohydrate interactions. *Microbiology.* 149:2873–2878.
 34. Rankl, C., F. Kienberger, ..., P. Hinterdorfer. 2008. Multiple receptors involved in human rhinovirus attachment to live cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105:17778–17783.
 35. Gilbert, Y., M. Deghorain, ..., Y. F. Dufre ne. 2007. Single-molecule force spectroscopy and imaging of the vancomycin/D-Ala-D-Ala interaction. *Nano Lett.* 7:796–801.
 36. Dufre ne, Y. F. 2004. Using nanotechniques to explore microbial surfaces. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:451–460.
 37. Dague, E., D. T. L. Le, ..., M. Mercier-Bonin. 2010. Probing *in vitro* interactions between *Lactococcus lactis* and mucins using AFM. *Langmuir.* 26:11010–11017.
 38. Boguslawska, J., J. Zycka-Krzesinska, ..., J. Bardowski. 2009. Intra- and interspecies conjugal transfer of Tn916-like elements from *Lactococcus lactis in vitro* and *in vivo*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:6352–6360.
 39. Chapot-Chartier, M.-P., E. Vinogradov, ..., S. Kulakauskas. 2010. Cell surface of *Lactococcus lactis* is covered by a protective polysaccharide pellicle. *J. Biol. Chem.* 285:10464–10471.
 40. Evans, E., and K. Ritchie. 1997. Dynamic strength of molecular adhesion bonds. *Biophys. J.* 72:1541–1555.
 41. Israelachvili, J. N. 1992. *Intermolecular and Surface Forces.* Academic Press, New York.
 42. Benoit, M., D. Gabriel, ..., H. E. Gaub. 2000. Discrete interactions in cell adhesion measured by single-molecule force spectroscopy. *Nat. Cell Biol.* 2:313–317.
 43. Walter, N., C. Selhuber, ..., J. P. Spatz. 2006. Cellular unbinding forces of initial adhesion processes on nanopatterned surfaces probed with magnetic tweezers. *Nano Lett.* 6:398–402.
 44. Baumgartner, W., P. Hinterdorfer, ..., D. Drenckhahn. 2000. Cadherin interaction probed by atomic force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:4005–4010.
 45. Baumgartner, W., H. J. Gruber, ..., D. Drenckhahn. 2000. Affinity of trans-interacting VE-cadherin determined by atomic force microscopy. *Single Molecules.* 1:119–122.
 46. Lebed, K., A. J. Kulik, ..., M. Lekka. 2007. Atomic force microscopy and quartz crystal microbalance study of the lectin-carbohydrate interaction kinetics. *Acta. Physica. Polonica A.* 111:273–286.
 47. Mehta, P., R. D. Cummings, and R. P. McEver. 1998. Affinity and kinetic analysis of P-selectin binding to P-selectin glycoprotein ligand-1. *J. Biol. Chem.* 273:32506–32513.
 48. Perret, E., A. Leung, ..., E. Evans. 2004. Trans-bonded pairs of E-cadherin exhibit a remarkable hierarchy of mechanical strengths. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101:16472–16477.
 49. Yuan, C., A. Chen, ..., V. T. Moy. 2000. Energy landscape of streptavidin-biotin complexes measured by atomic force microscopy. *Biochemistry.* 39:10219–10223.
 50. Dettmann, W., M. Grandbois, ..., H. E. Gaub. 2000. Differences in zero-force and force-driven kinetics of ligand dissociation from β -galactoside-specific proteins (plant and animal lectins, immunoglobulin G) monitored by plasmon resonance and dynamic single molecule force microscopy. *Arch. Biochem. Biophys.* 383:157–170.
 51. Sletmoen, M., T. K. Dam, ..., C. F. Brewer. 2009. Single-molecule pair studies of the interactions of the α -GalNAc (Tn-antigen) form of porcine submaxillary mucin with soybean agglutinin. *Biopolymers.* 91:719–728.
 52. Dieye, Y., V. Oxaran, ..., J. C. Piard. 2010. Functionality of sortase A in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:7332–7337.

53. Passerini, D., C. Beltramo, ..., P. Le Bourgeois. 2010. Genes but not genomes reveal bacterial domestication of *Lactococcus lactis*. *PLoS ONE*. 5:e15306.
54. Lo, Y.-S., Y.-J. Zhu, and T. P. Beebe. 2001. Loading-rate dependence of individual ligand-receptor bond-rupture forces studied by atomic force microscopy. *Langmuir*. 17:3741–3748.
55. Andre, G., K. Leenhouts, ..., Y. F. Dufrene. 2008. Detection and localization of single LysM-peptidoglycan interactions. *J. Bacteriol.* 190:7079–7086.
56. Alon, R., D. A. Hammer, and T. A. Springer. 1995. Lifetime of the P-selectin-carbohydrate bond and its response to tensile force in hydrodynamic flow. *Nature*. 374:539–542.

1.4. Identification et caractérisation des protéines de surface impliquées dans l'interaction entre *L. lactis* et la mucine PGM

Objectif : cette étude vise à identifier les déterminants moléculaires impliqués dans l'interaction *L. lactis*/PGM, en élargissant notre approche à la souche naturelle *L. lactis* ssp. *lactis* TIL448 et en approfondissant le rôle joué par les O-glycannes de PGM.

Matériels et méthodes : nous avons effectué des expériences AFM en mode spectroscopie de force selon la méthodologie mise au point dans les chapitres précédents, afin de quantifier les forces d'interaction entre PGM et TIL448. Pour mieux appréhender la spécificité de l'interaction, nous avons effectué des tests de blocage par PGM, sa partie O-glycannique ainsi que les fractions acide et neutre associées. Nous avons également évalué la muco-adhésion de la souche dérivée TIL1230 (élimination des plasmides par traitement à l'acridine orange). En outre, deux souches mutantes dans les gènes codant pour (i) la piline (TIL1289) et (ii) la protéine à domaines « MUB-like » (TIL1290) ont été testées. Nous nous sommes tout particulièrement intéressés à la distance de rupture, paramètre extrait directement des courbes de force AFM, relatives aux événements spécifiques.

Résultats : les propriétés muco-adhésives de TIL448 ont été démontrées, avec un faible pourcentage d'événements non adhésifs (seulement 2 %) et une forte proportion d'événements adhésifs spécifiques (60 %). Par comparaison des souches TIL448 et TIL1230, nous avons montré que les déterminants impliqués dans le phénotype muco-adhésif sont localisés sur des plasmides. Les mesures par AFM sur les mutants TIL1289 et TIL1290 ont prouvé le rôle combiné et équivalent joué par les pili et la protéine à domaines "MUB-like" (contributions proches en termes d'événements adhésifs spécifiques). L'analyse des courbes de force a permis de révéler que les événements adhésifs à courte distance (100-200 nm) et à longue distance (jusqu'à 600-800 nm) sont caractéristiques des interactions PGM/protéine à domaines « MUB-like » et PGM/pili, respectivement. En outre, les tests de blocage réalisés ont démontré que la fraction neutre des O-glycannes est majoritairement impliquée dans les interactions entre PGM et TIL448.

**Deciphering the role of surface proteins in the muco-adhesive properties
of *Lactococcus lactis* with AFM force spectroscopy**

Doan Thanh Lam Le ^{1,2,3,4,5,6}, **Mickaël Meyrand** ^{7,8}, **Yann Guérardel** ^{9,10}, **Pascal Loubière** ^{1,2,3}, **Marie-Pierre Chapot-Chartier** ^{7,8}, **Etienne Dague** ^{4,5,6*}, **Muriel Mercier-Bonin** ^{1,2,3*}

¹ Université de Toulouse; INSA, UPS, INP; LISBP, 135 Avenue de Rangueil, F-31077 Toulouse, France

² INRA, UMR792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400 Toulouse, France

³ CNRS, UMR5504, F-31400 Toulouse, France

⁴ CNRS ; LAAS ; 7 avenue du colonel Roche, F-31077 Toulouse cedex 4, France

⁵ CNRS ; ITAV-UMS3039 ; F31106 Toulouse, France

⁶ Université de Toulouse ; UPS, INSA, INP, ISAE; UT1, UTM, LAAS, ITAV ; F-31077 Toulouse cedex 4, France

⁷ INRA, UMR1319 Micalis, F-78350 Jouy-en-Josas, France

⁸ AgroParisTech, UMR Micalis, F-78350 Jouy-en-Josas, France

⁹ Université de Lille1, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UGSF, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France

¹⁰ CNRS, UMR 8576, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France

Corresponding authors:

Muriel Mercier-Bonin: Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, INSA, 135 avenue de Rangueil, 31077 Toulouse cedex 4, France.

Tel: +33 (0) 561 559 419

Fax: +33 (0) 561 559 400

E-mail: Muriel.Mercier-Bonin@insa-toulouse.fr

Etienne Dague: LAAS-CNRS; Université de Toulouse; 7 avenue du colonel Roche, F-31077

Tel: +33 (0) 561 337 841

Fax: +33 (0) 561 336 208

E-mail: edague@laas.fr

ABSTRACT

Interactions between *L. lactis* and pig gastric mucin (PGM) were measured at the single molecule level, using Atomic Force Microscopy. The nondairy strain *L. lactis* subsp. *lactis* TIL448, isolated from plant, was chosen due to: (i) atypical surface physico-chemical properties (high hydrophobicity), (ii) strong adhesion to polystyrene, (iii) specific adhesion to Caco-2 intestinal epithelial cells, compared to other hydrophobic *L. lactis* strains, (iv) synthesis of pili. In the present contribution, the muco-adhesive properties of TIL448 were assessed with a low level of non-adhesive events (only 2 %) and a high proportion of specific ones (60 %). Rupture events were observed at short distances (100-200 nm) and/or long distances (up to 600-800 nm). Blocking assays with free PGM or with total, acidic and neutral fractions of O-glycans demonstrated that neutral oligosaccharides played a major role in interactions between PGM and TIL448. We also showed that genetic determinants involved in the muco-adhesive phenotype of TIL448 were located on plasmids. Further AFM measurements on two specific derivative mutants demonstrated the combined role played by pili and “MUB-like” protein, with equivalent contribution in terms of specific adhesive events. Analysis of rupture distances confirmed that short-distance and long-distance adhesive events were characteristic of interactions between PGM and “MUB-like” protein and pili, respectively. This study is the first dissection of the muco-adhesive phenotype of *L. lactis*, in relation with bacterial surface determinants involved. Some specific structural characteristics, including nature, conformation and elongation, were identified.

Key words: *Lactococcus lactis*, PGM, oligosaccharides, AFM, single cell force spectroscopy, lacto-probe, rupture distance, pili, mucus-binding proteins

1. INTRODUCTION

The human gut microbiota is part of a highly complex bacterial ecosystem and several hundred different types of bacteria have been shown to colonize the gut [1]. Because they grow in close juxtaposition to host cells, mucosal bacteria are thought to play a particularly important role in gut health and distinct bacterial populations have been observed to occur on the gut epithelium in both health and disease-related processes [2]. In order to protect the mucosal epithelium, the host produces a thick layer of mucus covering the stomach, the small intestine and the large intestine [3, 4]. This protective barrier, which constitutes the first line of defense against physical and chemical injury [5], consists in two adjacent layers: a thin inner layer, which is sterile and physically difficult to dislodge, and a thicker outer one, which is not sterile and more diffuse [6, 7]. The major component of mucus is mucins that are responsible for its viscous, elastic gel-like and biological properties. The membrane-bound and secreted mucins are large glycoproteins exhibiting a protein backbone structure, linked to a complex array of hydrophilic oligosaccharide side-chains [8], representing potential ligands for microbial adhesins and/or energy source for commensal microorganisms in the outer mucus layer [9].

Physical interaction with the mucus layer, and especially mucins, is undoubtedly an important trait in understanding and improving the gut ecology. Compared with the present understanding of adhesive mechanisms of pathogenic bacteria, knowledge on the surface molecules mediating interactions with mucus is less advanced for beneficial microorganisms (probiotics, technological bacteria), like Lactic Acid Bacteria (LAB). Proteinaceous structures such as MUB-domain containing proteins have been recently depicted, using an *in silico* analysis [10]. Furthermore, the presence of pili and related muco-adhesion properties were reported in *Lactobacillus rhamnosus* GG [11], even though until recently non-pathogenic Gram positive bacteria were regarded as non-piliated bacteria.

Lactococcus lactis, considered as the model for LAB, is widely used as a starter in manufacturing cheese and other fermented dairy products. It is not usually considered as a normal element of the human intestinal microbiota, even though it was sporadically isolated from feces of many different groups of humans [12]. Indeed, in traditional “domesticated” *L. lactis* strains which live in a more restricted habitat than lactobacilli of the gastrointestinal

tract, the presence of only one single MUB-domain-containing protein has been reported [10]. However, Giaouris *et al.* [13] highlighted the diversity of surface physico-chemical properties (charge, hydrophobicity) among 50 natural *L. lactis* strains isolated from different origins (dairy, vegetal, animal). Passerini *et al.* [14] later reported the genetic and genomic diversity within a collection of 36 strains (*L. lactis* subsp. *lactis*) isolated from different ecological sources and geographical areas. The authors proposed a new classification based on ecological separation between “domesticated” strains and “environmental” strains, the latter being the main contributors to the genetic diversity within the subspecies. Such biodiversity may now afford an important pool of phenotypic functionalities, probably including muco-adhesion, for food (probiotics) and health-related applications (mucosal vaccine [15], therapeutic drug delivery [16]). In this framework, in continuity with our previous works on the dairy isolate IBB477 (*L. lactis* subsp. *cremoris*) [17], the present contribution was focused on elucidating at nanoscale, with AFM force spectroscopy, interactions between the model mucin PGM and the nondairy strain *L. lactis* subsp. *lactis* TIL448 isolated from peas. This strain was elsewhere shown to exhibit atypical surface physico-chemical properties with a high hydrophobicity measured by the MATS method (88 % affinity for hexadecane), resulting in high adhesion to polystyrene [13]. More recently, the specific adhesion to Caco-2 intestinal epithelial cells was established, compared to other hydrophobic *L. lactis* strains (M.-P. Chapot-Chartier, unpublished data). The presence of pili on the cell surface was, for the first time with natural *L. lactis* strains, assessed (M.-P. Chapot-Chartier, unpublished data). AFM force spectroscopy with dedicated lacto-probes was performed on TIL448 (and its plasmid-cured derivative TIL1230) and PGM coating by focusing on specific interactions (percentage of specific adhesive events, elongation and rupture distance, blocking assays with free PGM, O-glycans and neutral/acidic fractions). In order to identify the surface determinants of *L. lactis* involved (chemical nature, organization within the cell wall, conformational properties), further AFM experiments were carried out on two variants displaying mutations in a pilin gene and a gene-encoding a protein homologous to a mucus-binding protein (thereafter named “MUB-like” protein).

2. EXPERIMENTAL PROCEDURES

2.1. Bacterial strains, plasmids, growth conditions and preparation of suspensions

The bacterial strains used in this study are listed in Table 1. Bacterial stock cultures were kept at -80 °C in M17 broth (Oxoid), containing 0.5 % (w/v) glucose and 20 % (v/v) glycerol. Bacteria were first subcultured at 30 °C for TIL448 and TIL1230, and at 37 °C for the mutants TIL1289, TIL1290 and TIL1295 in M17-glucose (0.5 % (w/v)) medium. This preculture was then used to inoculate a 500-mL flask containing 100 mL of M17-glucose (0.5 % (w/v)) broth, which was incubated overnight at 30 °C for TIL448 and TIL1230, and at 37 °C for the mutants until the exponential phase was reached (optical density of 1.2 at a wavelength of 600 nm). Erythromycin (5 µg/mL) was added when required. Cells were harvested by centrifugation (4000 rpm, 10 min, room temperature) and washed twice with MilliQ-grade water, ready for lacto-probe preparation and further AFM measurements.

2.2. Preparation of the PGM-coated polystyrene surfaces

The mucin starting material was commercially available as a lyophilized powder (Sigma M1778). Partially purified type III mucin from porcine stomach, thereafter referred to as PGM (“Pig Gastric Mucin”), was dissolved in phosphate buffered saline (PBS) at pH=7.5 at a final concentration of 10 mg/mL. The solutions were prepared just before use.

Sterile Petri dishes, manufactured from crystal polystyrene (Greiner Bio-One SAS, Courtaboeuf, France), were cut into suitable pieces (1 x 1 cm²). Coupons were immersed in liquid detergent RBS 25 2 % (v/v) (Traitements Chimiques de Surfaces, Frelinghien, France) at 50°C for 15 minutes, rinsed in five successive baths of tap water at 50°C and five successive baths of tap water at room temperature, rinsed with copious amounts of MilliQ-grade water (50°C and room temperature) and finally air-dried for 15 min under a vertical flow hood (Cytosafe 2000, Faster, Italy). Surfaces were either used immediately for the following steps or stored in a desiccator at room temperature until use.

PGM adsorption onto polystyrene was performed as previously described with slight modifications [18]. Briefly, polystyrene (PS) substrata, prepared according to the above

procedure, were exposed overnight to a 10 mg/mL PGM solution in PBS pH=7.5 at 4 °C, under gentle agitation. After incubation, surfaces were copiously rinsed to remove loosely bound material using, in sequence, PBS buffer and MilliQ-grade water and finally dried with N₂.

2.3. Lacto-probe preparation

OTR4 (Si₃N₄) probes, purchased from Veeco Instruments SAS (Dourdan, France), were used for the lacto-probe preparation, as described elsewhere [18]. Briefly, cantilevers and tips, first cleaned for 15 min with UV/O₃ treatment, were pre-coated with polyethylenimine (PEI) by immersion for 5 hours in a PEI solution (0.1 % (w/v) in MilliQ-grade water), rinsed with a copious amount of MilliQ-grade water and stored under light vacuum. The negatively charged *L. lactis* cells [13], suspended in MilliQ-grade water (OD_{600nm}=1), were attached to the positively charged PEI-coated probes by electrostatic attraction, through a 20-min contact time. The lacto-probes, finally rinsed with MilliQ-grade water, were ready for AFM force spectroscopy experiments. The presence of immobilized bacteria on the AFM tip was detected by scanning electron microscopy (SEM; Hitachi S-3700N).

2.4. Force spectroscopy using AFM

AFM experiments were performed in PBS buffer and at room temperature, using the Catalyst system from Veeco Process Equipment Inc. (Santa Barbara, USA). Interactions between the lacto-probe and the PGM-coated polystyrene surface (PS+PGM) were assessed for each strain tested by recording single force-distance curves and matrix of 32 x 32 force-distance curves on 5 x 5 μm² squares. Experiments were performed in triplicate with independent PGM-coated surfaces and lacto-probes. Blocking assays were performed with free PGM (10 mg/mL in PBS) and O-glycans (total vs. acidic and neutral fractions, 10 mg/mL in PBS), prepared as previously described (recently published results, see *part III - 1.3*³). The spring constants of the tips were measured for each probe and were in the range 0.02 - 0.03 N/m. Adhesion forces, deduced from the force-distance curves, were quantified using Research Nanoscope 8.31 software from Veeco Instruments SAS. In brief, the deflection data, recorded during the

³ Ce renvoi en italiques fait référence aux différents chapitres de la partie Résultats du présent manuscrit.

retraction of the tip from the PGM-coated surface, were converted to force after multiplication with the spring constant of each individual cantilever, whereas the real tip-substrate distance was obtained by subtracting the deflection from the piezo movement. The point of zero distance was assigned at the intersection of the experimental curve with the straight line fitting the tail of the curve. Bond-rupture distances were deduced from the force *vs.* distance curves as the point of zero distance, subtracted from the point at which a negative deflection returns to zero.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The lacto-probe concept and the associated AFM measurements, previously described for MG1820 and IBB477 strains ([18] and recently published results, see *parts III - 1.2 and 1.3*), were applied to *L. lactis* subsp. *lactis* TIL448 for probing and elucidating interaction mechanisms with PGM.

3.1. Adhesive properties of TIL448 to PGM

A lacto-probe was prepared with TIL448 and examined by SEM (Figure 1A). As previously depicted ([18], see *part III - 1.2*), the sensitivity of a single cell on the AFM tip could not be achieved and clusters of cells were rather typically attached. Histograms of adhesion forces together with typical force-distance curves obtained when probing interactions between TIL448 and PGM-coated polystyrene are displayed in Figures 1B and 1C, respectively. The adhesion force and the repartition of the percentages corresponding to non-adhesive, non-specific adhesive and specific adhesive events are also summarized in Table 2. The significant muco-adhesive properties of TIL448 were clearly assessed with a low level of non-adhesive events (only 2 %) and a high proportion of specific ones (60 %), superior to that reported with IBB477 (20 %) (see *Part III - 1.3*). The adhesion force (0.18 ± 0.04 nN) was the same order of magnitude (0.22 ± 0.05 nN for IBB477). Rupture events were observed at short distances (100-200 nm) and/or long distances (up to 600-800 nm) (Figure 3A). This point will be further discussed.

In order to get a deeper understanding of the specificity of the adhesive events observed for TIL448, blocking assays with free PGM were carried out (Figure 2). To this end, the lacto-probe was incubated in PGM solution, before putting it in contact with the PGM-based coating. It was speculated that potential binding sites on the bacteria surface were saturated, with an efficiency correlated to their affinity towards PGM, and were thus not able to react anymore with the PGM layer. Pre-incubation of the TIL448 lacto-probe with PGM dramatically reduced the number of curves showing adhesive events as well as the measured binding forces, indicating that the adhesion forces measured using the lacto-probe were specific to the *L. lactis*/PGM interaction. Indeed, the percentage of non-adhesive events drastically increased, from 2 % to 84 % (Figures 2A and 2A'). The shape of force-distance curves after the lacto-probe incubation with free PGM (Figure 2B') confirmed the presence of non-adhesive events.

It is noteworthy that most *L. lactis* strains contain mobile genetic elements such as plasmids, responsible for the natural diversity between strains [19, 20]. Thus, genetic determinants for the observed muco-adhesive phenotype of TIL448 could be located on such mobile elements (*e.g.*, genes encoding surface proteins). To verify this hypothesis, a plasmid-cured derivative TIL1230 was constructed (M.-P. Chapot-Chartier, unpublished data) and its muco-adhesive properties were measured with AFM force spectroscopy. SEM image of TIL1230 lacto-probe, histograms of adhesion forces and typical force-distance curves are displayed in Figures 1D, 1E and 1F, respectively. The adhesion force and the repartition of the percentages corresponding to non-adhesive, non-specific adhesive and specific adhesive events are indicated in Table 2. TIL1230 strain exhibited an adhesion force of 0.09 ± 0.02 nN, 37 % of non-adhesive events and only 8 % of specific adhesive events, close to levels depicted for the low-adhesive control MG1820 [18]. All these results demonstrated that genetic determinants involved in the muco-adhesive phenotype of TIL448 are located on plasmids.

3.2. Role of surface proteins in adhesion of TIL448 to PGM

Two genes encoding surface proteins and located on plasmids were previously identified in TIL448 (M.-P. Chapot-Chartier, unpublished data). These genes, named *yhgE2* and *muc*, encode respectively a pilin and a protein homologous to a mucus-binding protein (thereafter named “MUB-like” protein). These two genes were inactivated by single cross over recombination, leading to strain TIL1289 (pilin mutant) and TIL1290 (“MUB-like” protein

mutant), respectively (Table 1). Since these mutants are erythromycin-resistant and have to be cultured at 37°C to avoid excision of pGhost-integrated vector (see Table 1), we first checked that the presence of erythromycin in the culture medium and growth at 37°C instead of 30°C, had no effect on adhesion of TIL448 to PGM. To this end, AFM force spectroscopy measurements on PGM coating were performed with the control strain TIL1295, a derivative of TIL448 containing pGKV259 plasmid (Table 1), grown at 37°C. The histogram of adhesion forces was similar to that achieved with TIL448 grown at 30°C in the absence of antibiotics (data not shown).

Interactions between muco-adhesive mutants (TIL1289 and TIL1290) and PGM coating were measured by AFM force spectroscopy. Adhesion force levels were lower than that obtained for the original strain (Table 2). Furthermore, the percentage of specific adhesive events was drastically reduced (26 % and 29 % for TIL1289 and TIL1290, respectively vs. 60 % for TIL448), which was correlated to a significant increase in the occurrence of non-adhesive events (31 % and 20 % for TIL1289 and TIL1290, respectively vs. 2 % for TIL448). The equivalent percentage of specific adhesive events recorded for both variants clearly indicates that pili and “MUB-like” protein equally contribute to the muco-adhesive properties of TIL448. To deeper investigate mechanisms involved, rupture distances extracted from specific adhesive events were closely analyzed. Corresponding histograms are presented in Figure 3. For TIL1289 (pilin mutant), long-distance adhesive events were suppressed (Figure 3B). In contrast, the mutation in the gene encoding the “MUB-like” protein coincided with the disappearance of short-distance adhesive events (Figure 3C). According to these results, we can hypothesize that the short-distance events correspond to interactions of “MUB-like” proteins with PGM whereas the long-distance events are rather representative of pili involvement. Francius *et al.*[21] analyzed rupture lengths when probing interactions between mechanically-trapped *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) cells and functionalized AFM tips with concanavalin A (Con A) or *Pseudomonas aeruginosa* lectin (PA-1). Interactions of Con A with mannose (or glucose)-rich polysaccharides on LGG cell wall showed rupture distances ranging from 20 to 400 nm, while much longer rupture lengths ranging from 100 to 1000 nm were observed in the case of interaction between PA-1 and galactose-rich polysaccharides. In our case, the short rupture distances (100-200 nm) observed with TIL448 and TIL1289 may reflect interactions between “MUB-like” proteins present on *L. lactis* cell wall with sugar receptors of PGM. One type of MUB domain-containing proteins is the lectin-like mannose-specific adhesin found in *Lactobacillus plantarum* WCFS1 [22], which is involved in

intestinal colonization and contributes to competitive exclusion of pathogens at mannose-containing receptors on epithelial cell surface. Besides, the long-distance rupture events (up to 600-800 nm) depicted for TIL448 and TIL1290 are most probably representative of interactions between pili and O-glycans of PGM. The presence of pili and related muco-adhesion properties were previously reported in LGG [11, 23]. Such properties were expected to confer to LGG a distinct advantage over non-piliated probiotic lactobacilli for maintaining extended or stable residence in the gastrointestinal tract [23]. However, we should note that, in this study, no precise interaction mechanism was proposed. The present work is indeed the first dissection of the muco-adhesive phenotype of *L. lactis*, in relation with the specific surface determinants involved (nature, conformation and elongation). The role of pili will be further investigated on the reference strain *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 (see *part III - 2.3*).

3.3. Role of mucin O-glycans in adhesion of TIL448 to PGM

Glycans present in mucin molecules are mainly O-linked [8, 24] and represent potential receptor-binding sites for bacteria. Nordman *et al.* [25] showed that pig gastric mucus contains a number of distinctly different mucin populations varying in buoyant density, size, “acidity”, glycosylation, sulphation and tissue origin. Differences in “acidity” were mainly ascribed to differences in sulphation. Structure and composition of neutral oligosaccharides were also identified [26]. On this basis, in continuity with results described above with PGM, further blocking assays were performed on TIL448 with total, acidic and neutral fractions of O-glycans. Histograms of adhesion forces before and after blocking are displayed on Figure 4. We systematically observed significant increases in percentage of non-adhesive events after blocking (Table 3). Inhibition of adhesion with O-glycans ($76 \% \pm 5 \%$) was of the same order of magnitude as the value reported for free PGM ($80 \% \pm 4 \%$). Note that inhibition percentage with total O-glycans was higher than that reported for IBB477 (76 % against 48 %, for TIL448 and IBB477, respectively) (recently published results, see *part III 1.3*), probably in line with differences between these two strains in terms of cell wall components involved in muco-adhesion. In addition, the neutral oligosaccharidic fraction exerted a higher blocking effect than the acidic one (42 % vs. 11 %) (Table 3). Composition and structure analysis of the neutral and acidic oligosaccharides is under progress. Such information will be highly valuable to complete our functional characterization of the specific interactions between *L. lactis* surface proteins (pili, “MUB-like” proteins) and PGM or intestinal mucins.

In conclusion, the muco-adhesive properties of the nondairy strain *L. lactis* subsp. *lactis* TIL448 were assessed using AFM force spectroscopy. The combined role played by pili and “MUB-like” protein was demonstrated through the detailed analysis of specific adhesive events (proportion, rupture distance). This study should lead to a better understanding of interactions of *L. lactis* with the mucosal environment in the gastrointestinal tract, with a special interest for bacterial surface proteins and their receptor counterparts, mediating adhesion to mucus. We hope that these findings on *L. lactis* muco-adhesion will have broad implications for medical and food-related applications, notably by selecting probiotic candidates and defining improved drug-delivery strategies.

Acknowledgements

This work was supported by INRA (CEPIA and MICA Departments) through the doctoral grant of D.T.L. Le (2008-2011). Thanks are also due to Marie-Pierre Duviou (LISBP, Toulouse, France) and Mélodie Goin (MICALIS, Jouy-en-Josas, France) for their technical support.

REFERENCES

1. Eckburg, P.B., *et al.*, *Diversity of the human intestinal microbial flora*. *Science*, 2005. **308**(5728): p. 1635-1638.
2. Macfarlane, S., M.J. Hopkins, and G.T. Macfarlane, *Bacterial growth and metabolism on surfaces in the large intestine*. *Micro. Ecol. Health Dis.*, 2000. **12**(2): p. 64-72.
3. Cone, R.A., *Barrier properties of mucus*. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2009. **61**(2): p. 75-85.
4. Atuma, C., *et al.*, *The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo*. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2001. **280**(5): p. G922-G929.
5. Neutra, M. and J. Forstner, *Gastrointestinal mucus: synthesis, secretion, and function*, in *Physiology of the gastrointestinal tract*, L. Johnson, Editor 1987, Raven Press: New York.
6. Johansson, M.E.V., J.M. Holmén Larsson, and G.C. Hansson, *The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2010. **108**(Suppl 1): p. 4659-4665.
7. Johansson, M.E.V., *et al.*, *The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2008. **105**(39): p. 15064-15069.
8. Bansil, R. and B.S. Turner, *Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications*. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2006. **11**(2-3): p. 164-170.
9. McGuckin, M.A., *et al.*, *Mucin dynamics and enteric pathogens*. *Nat. Rev. Micro.*, 2011. **9**(4): p. 265-278.
10. Boekhorst, J., *et al.*, *Comparative analysis of proteins with a mucus-binding domain found exclusively in lactic acid bacteria*. *Microbiology*, 2006. **152**(1): p. 273-280.
11. Kankainen, M., *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**(40): p. 17193-17198.
12. Finegold, S.M., V.L. Sutter, and G.E. Mathisen, *Human intestinal microflora in health and disease*, ed. D.J. Hentges 1983, New York: Academic Press.
13. Giaouris, E., M.-P. Chapot-Chartier, and R. Briandet, *Surface physicochemical analysis of natural *Lactococcus lactis* strains reveals the existence of hydrophobic and low charged strains with altered adhesive properties*. *Inter.J. Food Microbiol.*, 2009. **131**(1): p. 2-9.
14. Passerini, D., *et al.*, *Genes but not genomes reveal bacterial domestication of *Lactococcus lactis**. *PLoS ONE*, 2010. **5**(12): p. e15306.
15. Neutra, M.R. and P.A. Kozlowski, *Mucosal vaccines: the promise and the challenge*. *Nat. Rev. Immunol.*, 2006. **6**(2): p. 148-158.
16. Steidler, L. and P. Rottiers, *Therapeutic drug delivery by genetically modified *Lactococcus lactis**. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2006. **1072**(1): p. 176-186.
17. Boguslawska, J., *et al.*, *Intra- and interspecies conjugal transfer of Tn916-like elements from *Lactococcus lactis* in vitro and in vivo*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2009. **75**(19): p. 6352-6360.
18. Dague, E., Le, D.T.L., *et al.*, *Probing in vitro interactions between *Lactococcus lactis* and mucins using AFM*. *Langmuir*, 2010. **26**(13): p. 11010-11017.
19. Siezen, R.J., *et al.*, *Genome-scale diversity and niche adaptation analysis of *Lactococcus lactis* by comparative genome hybridization using multi-strain arrays*. *Micro. Biotech.*, 2011. **4**(3): p. 383-402.

20. van Hylckama Vlieg, J.E.T., *et al.*, *Natural diversity and adaptive responses of Lactococcus lactis*. *Curr. Opin. Biotech.*, 2006. **17**(2): p. 183-190.
21. Francius, G., *et al.*, *Detection, localization, and conformational analysis of single polysaccharide molecules on live bacteria*. *ACS Nano*, 2008. **2**(9): p. 1921-1929.
22. Pretzer, G., *et al.*, *Biodiversity-based identification and functional characterization of the mannose-specific adhesin of Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.*, 2005. **187**(17): p. 6128-6136.
23. von Ossowski, I., *et al.*, *Mucosal adhesion properties of the probiotic Lactobacillus rhamnosus GG SpaCBA and SpaFED pilin subunits*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2010. **76**(7): p. 2049-2057.
24. Kim, Y. and S. Ho, *Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress*. *Curr. Gastroenterol. Rep.*, 2010. **12**(5): p. 319-330.
25. Nordman, H., *et al.*, *Mucus glycoproteins from pig gastric mucosa: identification of different mucin populations from the surface epithelium*. *Biochem. J.*, 1997. **326**: p. 903-910.
26. Karlsson, N.G., *et al.*, *Glycosylation differences between pig gastric mucin populations: a comparative study of the neutral oligosaccharides using mass spectrometry*. *Biochem. J.*, 1997. **326**: p. 911-917.

Table 1. Bacterial strains used in this study.

Strain	Characteristics	Source
TIL448	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO2110, isolated from peas	INRA collection
TIL1230	Derivative of TIL448 obtained after curing several plasmids by acridine orange treatment	M.-P. Chapot-Chartier Micalis, INRA, Jouy-en-Josas, France
TIL1289	Ery ^R ; pilin mutant of TIL448; SCO* mutant obtained by disruption of <i>yhgE2</i> gene encoding a pilin with the use of thermosensitive plasmid pGhost 9	M.-P. Chapot-Chartier Micalis, INRA, Jouy-en-Josas, France
TIL1290	Ery ^R ; “MUB-like” protein mutant of TIL448; SCO mutant obtained by disruption of <i>muc</i> gene encoding a protein homologous to a mucus-binding protein, with the use of thermosensitive plasmid pGhost 9	M.-P. Chapot-Chartier Micalis, INRA, Jouy-en-Josas, France
TIL1295	Ery ^R ; Control strain TIL448 containing empty plasmid pGKV259	M.-P. Chapot-Chartier Micalis, INRA, Jouy-en-Josas, France

* SCO, single cross over

Table 2. Adhesion forces and percentage of non-adhesive, non-specific and specific events obtained using AFM force spectroscopy on TIL448, TIL1230, TIL1289 and TIL1290 lacto-probes in contact with PGM-coated polystyrene in milliQ-grade water.

		TIL448	TIL1230	TIL1289	TIL1290
Force (nN)	PGM coating	0.18 ± 0.04	0.09 ± 0.02	0.10 ± 0.03	0.12 ± 0.04
Percentage of events	Non-adhesive	2 %	37 %	31 %	20 %
	Non-specific adhesive	38 %	55 %	43 %	51 %
	Specific adhesive	60 %	8 %	26 %	29 %

Table 3. AFM blocking assays for TIL448 lacto-probe in contact with PGM-coated polystyrene. The given results are the average value and standard deviation over three independent PGM-coated coupons and lacto-probes.

Solution (10 mg/mL)	PGM	O-glycans	Acidic fraction	Neutral fraction
% blocking	80 % ± 4 %	76 % ± 5 %	11 % ± 5 %	42 % ± 10 %

FIGURE CAPTIONS

Figure 1. (A, D) Representative SEM images of the biologically-functionalized probe for *L. lactis* cells immobilized onto AFM tip and cantilever; (B, E) histograms of adhesion forces and (C, F) typical force-distance curves obtained when probing interactions between TIL448 (A, B, C) and TIL1230 (D, E, F) and PGM-coated polystyrene using AFM force spectroscopy in milliQ-grade water.

Figure 2. (A, A') Histograms of adhesion forces and (B, B') typical force-distance curves for TIL448 lacto-probe after contact with PGM-coated polystyrene before (A, B) and after (A', B') incubation with free PGM.

Figure 3. Histograms of rupture distances corresponding to specific adhesive events for (A) TIL448; (B) pilin mutant TIL1289 and (C) "MUB-like" protein mutant TIL1290. Interactions with PGM-coated polystyrene were measured by AFM force spectroscopy in milliQ-grade water.

Figure 4. Histograms of adhesion forces for TIL448 lacto-probe before (A, B, C) and after (A', B', C') incubation with free O-glycans (A, A'), neutral fraction (B, B') and acidic fraction (C, C').

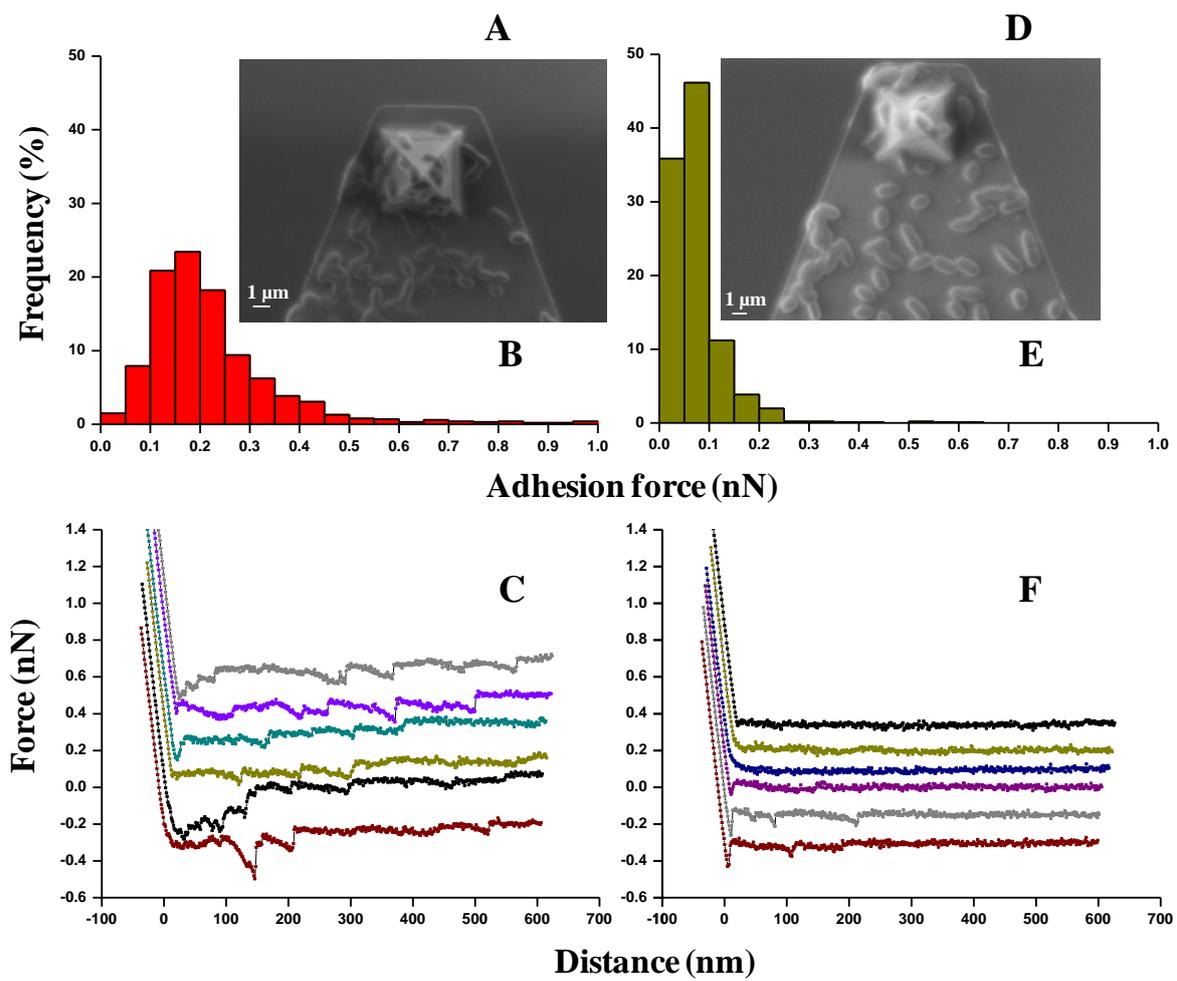


Figure 1

D. T. L. Le *et al.*

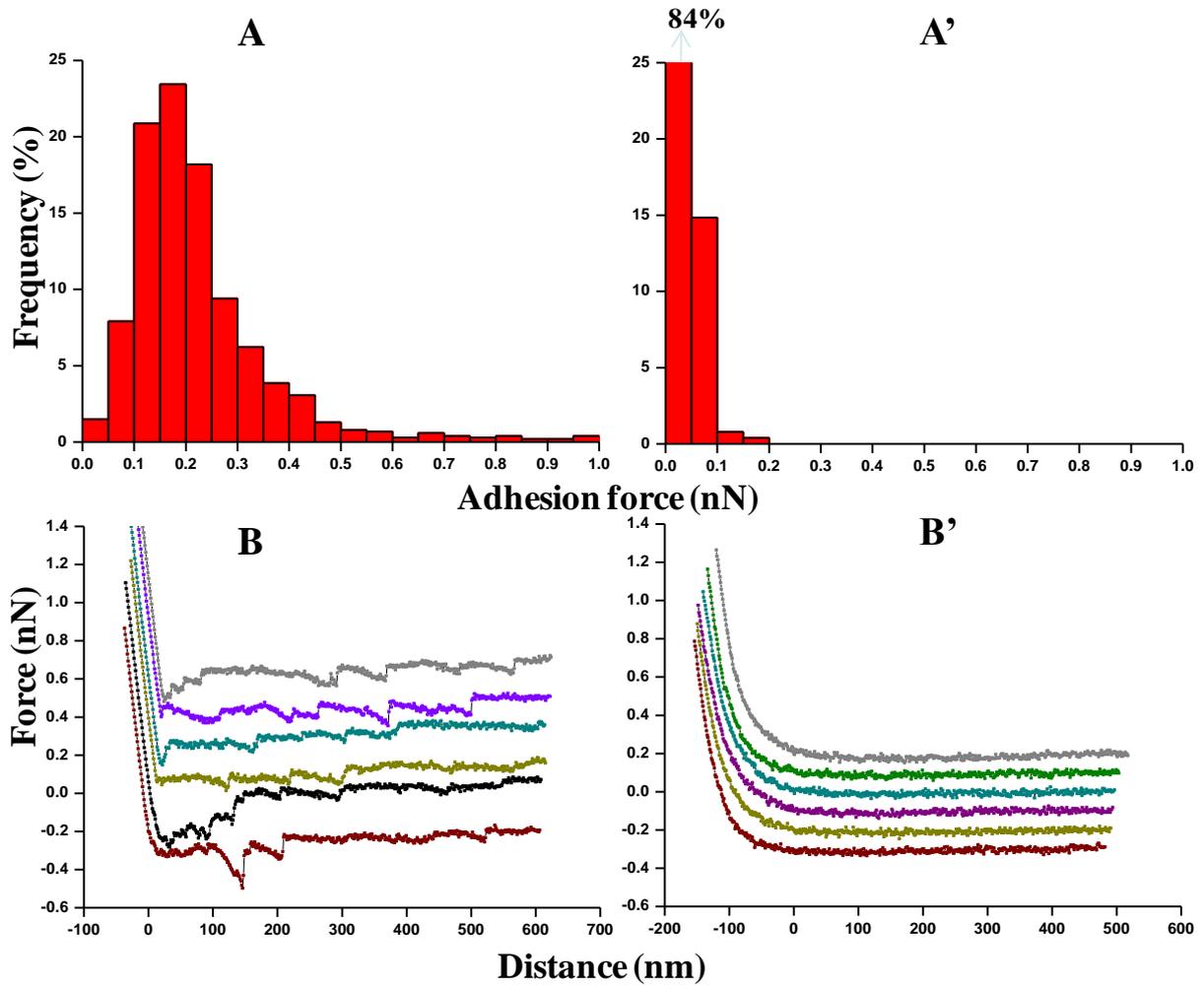


Figure 2

D. T. L. Le *et al.*

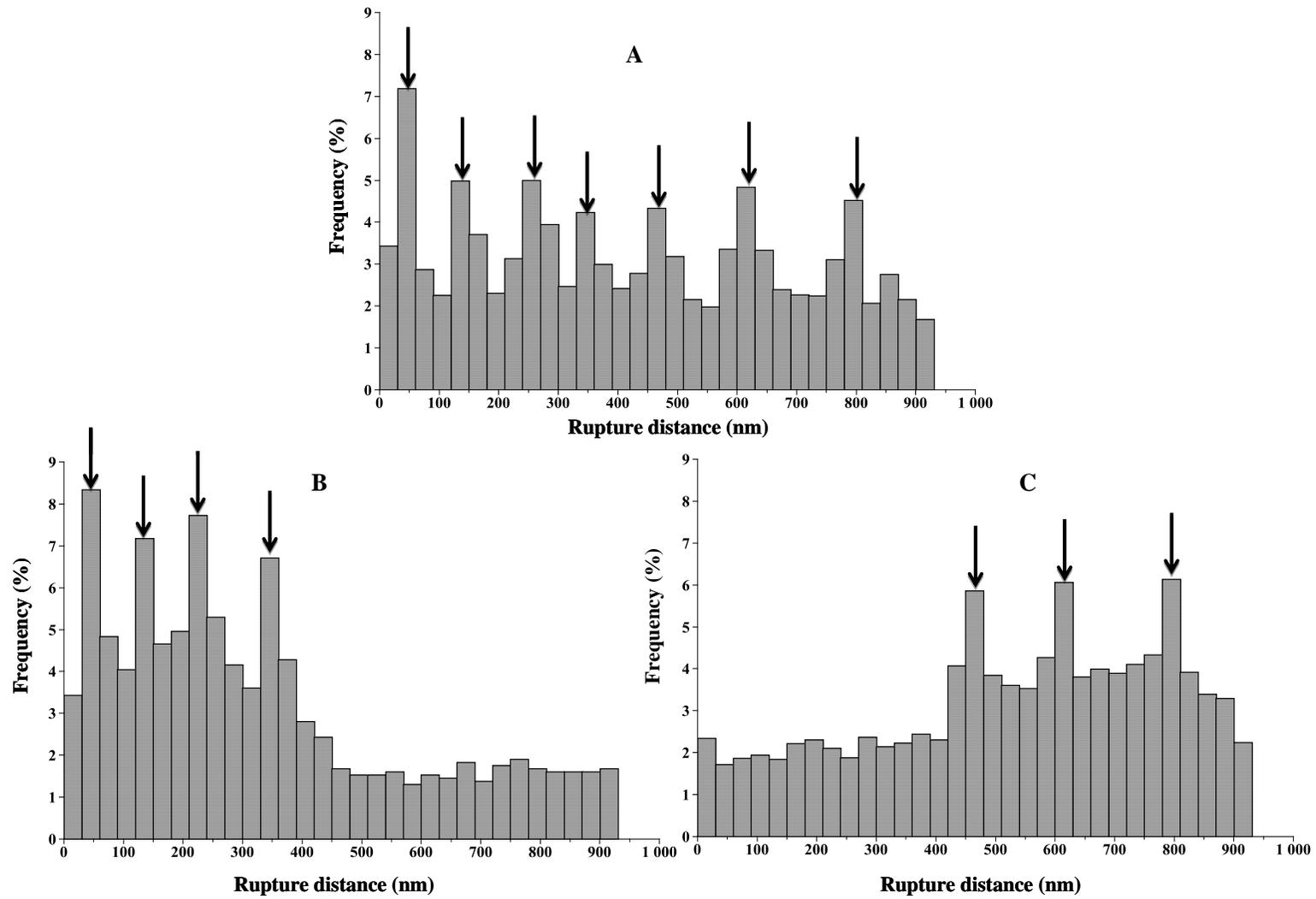


Figure 3

D. T. L. Le *et al.*

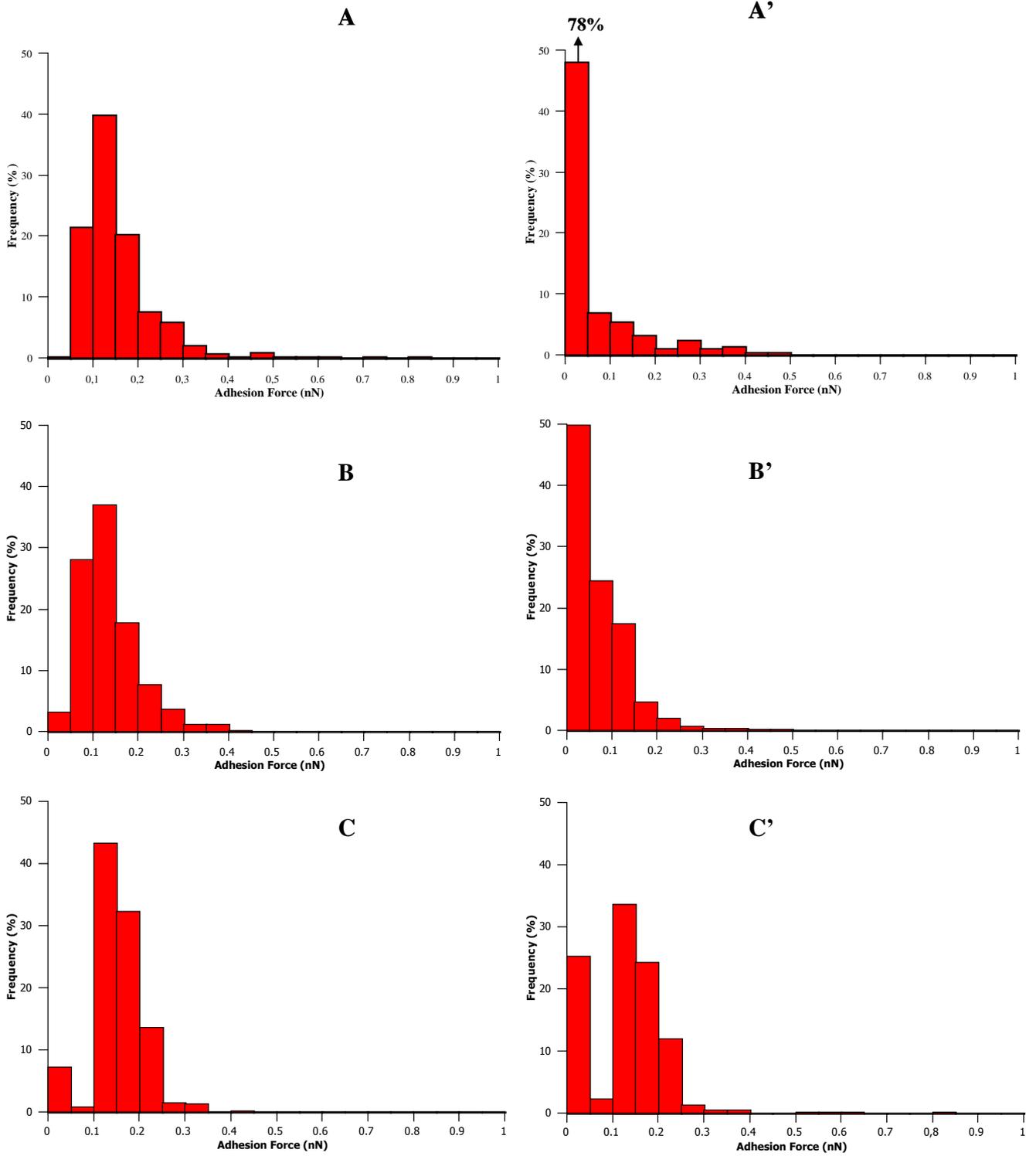


Figure 4

D. T. L. Le *et al.*

2. A l'échelle de l'ensemble de la population bactérienne

2.1. Quantification des propriétés muco-adhésives de *L. lactis* par Microbalance à quartz à mesure de dissipation (QCM-D)

Objectif : afin de confirmer les différences dans les propriétés muco-adhésives observées par AFM pour IBB477 et MG1820 et de manière à se rapprocher de l'environnement *in vivo*, cette étude a porté sur les interactions entre *L. lactis* et PGM à l'échelle de l'ensemble de la population bactérienne, en conditions dynamiques, avec l'utilisation de la microbalance à quartz à mesure de dissipation (QCM-D).

Matériels et méthodes : le système QCM-D a été mis en œuvre pour appréhender, *in situ* et en temps réel, (i) l'adsorption de PGM sur un quartz recouvert de polystyrène (PS+PGM) puis (ii) l'adhésion des souches MG1820 et IBB477 à la surface PS+PGM (contrôle également effectué sur PS vierge) en solution saline (tampon PBS), avec en parallèle la quantification par microscopie à épifluorescence des cellules totales adhérees, par marquage au DAPI.

Résultats : la mesure simultanée des changements dans la fréquence de résonance (Δf) et de la dissipation (ΔD) sur le quartz recouvert de polystyrène a démontré un processus d'adsorption de PGM en deux phases, correspondant à la transition progressive d'un film rigide vers une couche plus « molle » et dissipative. L'analyse par XPS a confirmé la présence de mucine adsorbée. Le modèle de Voigt a ensuite été mis en œuvre pour décrire les données de QCM-D en termes de propriétés viscoélastique et mécanique de la couche PGM (épaisseur, viscosité et module élastique). En particulier, l'épaisseur prédite est cohérente avec la valeur expérimentale, mesurée par l'AFM. L'adhésion de *L. lactis* aux surfaces PS et PS+PGM a ensuite été évaluée. Dans les deux cas, des variations de fréquence positives ont été observées, probablement selon la théorie de l'« oscillateur-couplé », récemment proposée dans la littérature pour les bactéries. La présence de la couche de PGM réduit fortement l'adhésion de *L. lactis* par rapport au quartz recouvert de polystyrène seul. Cependant, l'adhésion de la souche IBB477 à PGM est plus marquée que celle obtenue pour MG1820 (forte augmentation de Δf , du nombre de cellules adhérees et du ratio $\Delta D/\Delta f$). L'ensemble de ces résultats confirme les tendances observées à l'échelle de la cellule unique par AFM.

Real-time investigation of *Lactococcus lactis* muco-adhesive properties using quartz crystal microbalance with dissipation monitoring

Publication soumise en septembre 2011 à Langmuir

Doan Thanh Lam Le^{1,2,3,4,5}, **Pascal Loubière**^{1,2,3}, **Etienne Dague**^{4,5,6*}, **Muriel Mercier-Bonin**^{1,2,3*}

¹ Université de Toulouse; INSA, UPS, INP; LISBP, 135 Avenue de Rangueil, F-31077 Toulouse, France

² INRA, UMR792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400 Toulouse, France

³ CNRS, UMR5504, F-31400 Toulouse, France

⁴ CNRS ; LAAS ; 7 avenue du colonel Roche, F-31077 Toulouse cedex 4, France

⁵ CNRS ; ITAV-UMS3039 ; F31106 Toulouse, France

⁶ Université de Toulouse ; UPS, INSA, INP, ISAE; UT1, UTM, LAAS, ITAV ; F-31077 Toulouse cedex 4, France

Corresponding authors:

Muriel Mercier-Bonin: Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, INSA, 135 avenue de Rangueil, 31077 Toulouse cedex 4, France.

Tel: +33 (0) 561 559 419

Fax: +33 (0) 561 559 400

E-mail: Muriel.Mercier-Bonin@insa-toulouse.fr

Etienne Dague: LAAS-CNRS; Université de Toulouse; 7 avenue du colonel Roche, F-31077

Tel: +33 (0) 561 337 841

Fax: +33 (0) 561 336 208

E-mail: edague@laas.fr

ABSTRACT

The present work was devoted to probe, at the entire population level, interactions between *Lactococcus lactis*, the lactic acid bacteria model, and intestinal mucus, with a special interest for mucins. To this end, QCM-D experiments were performed for real-time monitoring adsorption on polystyrene of the model mucin PGM (“Pig Gastric Mucin”) and subsequent adhesion of *L. lactis*, with a view of comparing the muco-adhesive properties of two different strains (IBB477 and the control MG1820). Measuring simultaneously the shifts in resonance frequency and dissipation on a polystyrene-coated crystal demonstrated for the first time a two-phase process for PGM adsorption, which corresponds to the transition with time from a stiff to a less rigid and dissipative film. XPS analysis confirmed the presence of mucin on the quartz crystal. The Voigt-based model was then used to describe the QCM-D outputs in terms of mechanical properties of the viscoelastic PGM layer (thickness, shear viscosity and elastic shear modulus). In particular, the predicted thickness was consistent with the experimental value, measured by AFM. Adhesion of *L. lactis* to the PGM-coated crystal was then monitored, in combination with a direct counting of attached cells using epifluorescence microscopy. Comparison with bare polystyrene (*i.e.*, no PGM coating) was performed. For both surfaces, positive frequency shifts were caused by adhering bacteria, probably according to the coupled-oscillator theory. The presence of PGM coating strongly reduced bacterial adhesion with respect to bare polystyrene. However, adhesion of IBB477 to PGM was significantly increased in comparison with MG1820 (sharp increases in Δf and in the number of attached cells, higher $\Delta D/\Delta f$ ratio), showing that muco-adhesion may be a highly variable and valuable phenotypic trait among *L. lactis* strains.

Key words: *Lactococcus lactis*, mucin, QCM-D, XPS, viscoelasticity, glycoprotein adsorption, bacterial adhesion, positive frequency shift, epifluorescence microscopy

I. INTRODUCTION

Mucosal adhesion is a pre-requisite for the bacterial colonization in the gastrointestinal tract and a key mechanism for the probiotic activity, especially for lactic acid bacteria (LAB)^{1,2}. Therefore, besides biological and physiological effects, physical interaction with exposed host surfaces, and especially the mucus layer, is undoubtedly an important trait in understanding and improving the gut ecology through the balance of putative beneficial over pathogenic bacteria. To date, direct adhesion forces to mucus remain poorly investigated, especially for beneficial microorganisms (probiotics, technological bacteria), like LAB. In our previous work³, we focused on the role of mucins, which are heavily O-glycosylated proteins responsible for the physical properties of mucus gels and involved in numerous interactions within the gastrointestinal tract⁴. To this end, we designed a lacto-probe for AFM force spectroscopy measurements to successfully evaluate, at the single cell level, interactions between PGM (“Pig Gastric Mucin”) and *Lactococcus lactis*, the model for LAB. Both non-specific and specific forces were emphasized. *L. lactis* is widely used as a starter in manufacturing cheese and other fermented dairy products. It is not usually considered as a normal element of the human intestinal microbiota, even though it was sporadically isolated from feces of many different groups of humans⁵. Indeed, the presence of mucus-binding (MUB) domain-containing proteins has been highlighted in lactococci, using an *in silico* analysis⁶. Furthermore, the biodiversity among a large panel of natural *L. lactis* strains in terms of surface physico-chemical properties⁷ and ecological niches⁸, may afford an important pool of functionalities for food (probiotics) and health-related applications (mucosal vaccine⁹, therapeutic drug delivery¹⁰), both potentially involving muco-adhesion.

In continuity with our previous work on AFM force spectroscopy at the single-cell scale³, *L. lactis*/PGM interactions were probed in the present contribution at the entire population level under controlled hydrodynamics. To this end, the quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D) was, for the first time, devoted to bacterial muco-adhesion by focusing on the dynamics of the interface between adhering *L. lactis* cells and PGM coating in a non-destructive and non-disruptive manner. QCM-D is an acoustic method used for monitoring various complex interfacial processes (adsorption kinetics, mechanical properties of molecular films at the solid/liquid interface). This technique is based on quartz’s inherent property of piezoelectricity. By applying alternating electric fields to the quartz, a back and forth deformation in the bulk material at its resonant frequency is induced, and mass loading

on the quartz surface causes a decrease in frequency ¹¹. This frequency shift is only proportional to the attached mass when the mass is rigid and tightly coupled to the surface. In contrast, when a flexible mass is attached, non-rigidity causes deformation during oscillation, resulting in dissipative energy losses. The simultaneous measurements of frequency shifts (Δf) and dissipation (ΔD) ¹² allow a better insight into the viscoelastic properties of the adsorbed mass. Many authors thus used QCM-D for investigating interaction(s) between solutes and functionalized surfaces, as occurring during protein adsorption ¹³⁻¹⁵. Examples involving bacteria are scarce, probably due to the difficult interpretation of QCM-D output parameters ¹⁶. However, designing QCM-D strategies for bacterial adhesion is nowadays of major interest and constitutes an important field of investigation. In this framework, an increasing attention is paid to QCM-D response for bacteria, in relation with their surface properties (morphology, nanomechanical properties, surface appendages, EPS secretion...) ^{16,17}.

The aim of this study was to determine QCM-D output parameters (Δf and ΔD) as a function of time, during adsorption of PGM to a polystyrene-coated QCM crystal. Based on this data set, Voigt-based viscoelastic modeling was used to evaluate mechanical properties of the PGM layer (thickness, shear viscosity and elastic shear modulus). In addition, XPS and AFM experiments were carried out to complete characterization of the PGM layer and confirm modeling results. The subsequent adhesion of two *L. lactis* strains to the PGM-coated crystal was monitored using QCM-D, using bare polystyrene as reference. We focused on the strain MG1820, depicted in terms of *in vitro* muco-adhesion in our previous work ³ and the IBB477 strain, which exhibited efficient persistence in the rat gastrointestinal tract, when tested *in vivo* ¹⁸. In parallel, the final number of adhering bacteria to the crystal surface was estimated. Data were then combined to establish differences between the muco-adhesive properties of both strains towards the model mucin PGM.

II. METHODS

Bacterial strains, growth conditions and preparation of suspensions

L. lactis subsp. *cremoris* strains IBB477 and MG1820 were used throughout this study. IBB477 was originally isolated from samples of Polish artisanal dairy products¹⁸. Bacterial stock cultures were kept at -80 °C in M17 broth (Oxoid), containing 2 % (w/v) lactose and 20 % (v/v) glycerol. Bacteria were first subcultured at 30 °C in M17-lactose (2 % (w/v)) medium. This preculture was then used to inoculate a 500 mL-flask containing 100 mL of M17-lactose (2 % (w/v)) broth, which was incubated overnight at 30 °C until the early stationary phase was reached (optical density of 5.0 at a wavelength of 580 nm, which corresponded to 2.5×10^9 CFU/mL, as determined by plating). Cells were harvested by centrifugation (4000 rpm, 10 min and room temperature) and washed twice with PBS. Suspensions of both IBB477 and MG1820 strains were used for further QCM-D experiments.

Preparation of PGM solution

The mucin starting material was commercially available as a lyophilized powder (Sigma M1778). Partially purified type III mucin from porcine stomach, thereafter referred to as PGM (“Pig Gastric Mucin”), was dissolved in phosphate buffered saline (PBS) at pH=7.5 at a final concentration of 10 mg/mL. The solutions were prepared just before use.

QCM-D experiments

Adsorption of PGM and bacterial adhesion were studied under flow using a QCM-D device, model Q-sense E4 (Q-sense, Gothenburg, Sweden). The E4 unit consists of a measurement platform that can hold four sensor flow chambers. Before each experiment, the QCM crystals, pre-coated with a polystyrene (PS) surface on a gold substrate (purchased from Q-sense), were first cleaned by 10-min UV/ozone treatment, then rinsed with Milli-Q water and nitrogen-dried. The chamber and tubing were cleaned with a 1 % (v/v) Hellmanex solution in Milli-Q water, followed by flushing with Milli-Q water. For each experiment, the temperature was set to 20 °C and PBS buffer was pumped over the crystal sensor for at least 20 min, using a constant flow rate of 50 μ L/min. The QCM-D flow chamber is disk-shaped with an internal volume of 100 μ L and a diameter of 14 mm with the inlet and outlet facing the crystal

surface. The flow applied creates an approximate shear rate of 0.3 s^{-1} . When stable baselines for both frequency f and dissipation D were observed, PGM solution (10 mg/mL) and bacterial suspension (2.5×10^9 UFC/mL) were introduced in sequence, for 30-min and 120-min duration, respectively. Intermediate PBS rinse was achieved at the same flow rate, which was continued until the frequency and dissipation changes stabilized. Control experiments for both IBB477 and MG1820 strains were carried out in parallel on bare polystyrene, *i.e.*, without any injection of PGM solution. All experiments were performed in triplicate on independent crystals and separately grown cultures.

Shifts in frequency and dissipation were measured and recorded in real-time at all harmonics (fundamental frequency, 3rd, 5th, 7th, 9th, 11th and 13th overtones) with the QSoft 401 software (Q-sense, Gothenburg, Sweden) throughout the PGM adsorption and *L. lactis* adhesion processes, for both strains. Responses from the 7th overtone and beyond were nearly the same, both qualitatively and quantitatively and, therefore, data corresponding to 9th, 11th and 13th overtones are not here presented. Further analysis was performed using the Qtools software (Q-sense, Gothenburg, Sweden). Indeed, a Voigt-based model was used to describe the viscoelastic properties of the PGM film (*i.e.*, after QCM-D experiments carried out without any injection of bacteria).

The PGM-coated polystyrene QCM crystal was characterized by AFM scratch test, in order to relate frequency and dissipation shifts in QCM-D to the PGM layer thickness. An area ($3 \times 3 \mu\text{m}^2$) was first recorded at high forces (10 nN), followed by imaging a larger image ($10 \times 10 \mu\text{m}^2$) under normal load (1 nN). In parallel, the elemental composition of the crystal surface before and after PGM adsorption, with final PBS buffer and milliQ-grade water rinsing, was assessed with X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), using a Thermo Electron Escalab 250 spectrometer equipped with a monochromated Al K_{α} X-ray source ($h\nu = 1486.6 \text{ eV}$, spot size = $500 \times 500 \mu\text{m}^2$). Survey spectra and high-resolution spectra were recorded at pass energies of 100 eV and 20 eV respectively. The spectrometer was calibrated against Au4f_{7/2} binding energy (84.1 eV). The following core levels were analysed: C1s, O1s, S2p and N1s. The photoelectron take-off angle between the surface and the direction in which the photoelectrons are analysed was 90° . Curve fitting of the spectra was performed with the Thermo Electron software Advantage.

Estimation of the total number of cells attached to the crystal surface

The total cell number was estimated for both IBB477 and MG1820 strains, after the 120-min adhesion step to bare or PGM-coated polystyrene crystal, in order to relate frequency and dissipation shifts in QCM-D to changes in bacterial retention. To this end, after final PBS rinse, crystals were carefully removed from the QCM-D flow chamber and stained with DAPI 0.5 mg/mL (DAPI dihydrochloride, Molecular Probes, Invitrogen, 358-461 nm) at room temperature, for 5 min. Attached bacteria were directly counted on the crystal surface using epifluorescence microscopy (Leica DM4000B, USA) at magnification of 40x. At least 15 fields of view were counted for each condition.

III. RESULTS AND DISCUSSION

In this study, QCM-D output parameters (Δf and ΔD) were recorded as a function of time, during adsorption of PGM and subsequent adhesion of two *L. lactis* strains (IBB477 vs. the control MG1820) to the PGM-coated crystal under flow, in order to establish differences between muco-adhesive properties at the entire bacterial population level.

Adsorption of PGM to the polystyrene-coated QCM crystal under flow

Changes in frequency (Δf) and dissipation (ΔD), observed during PGM adsorption to the polystyrene-coated QCM crystal, are displayed as a function of time in Figures 1a and 1b, respectively. Signals simultaneously collected from the first three resonance overtones ($n = 3, 5, 7$) are shown. To allow for a direct comparison of the frequency shifts measured at the different harmonics, Δf is in Figure 1a divided by n . PBS buffer was first pumped over the crystal sensor for at least 15 min, using a constant flow rate of 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ (phase I). Note that stable baselines for both f and D were immediately achieved. The PGM solution was then introduced and left to adsorb under flow for 30 min (phases II and III). The surface was rinsed with PBS buffer (phase IV). Immediate and rapid adsorption of PGM onto polystyrene occurred, leading to a sharp decrease in frequency (*i.e.*, mass uptake) and increase in dissipation during the phase II (Figures 1a and 1b, respectively). Signals then tended to level-off over the 30-min PGM injection period. Subsequent introduction of PBS buffer resulted in a small increase in frequency and an abrupt drop in dissipation (Figures 1a and 1b, respectively), due to rinsing away mucin which was loosely associated to the adsorbed layer. However, signal intensities kept significantly higher than the initial baseline, clearly indicating that a firmly anchored film remained at the crystal surface.

Comparing changes in frequency from different overtones can be valuable since the propagation of the crystal resonance energy into the adsorbed layer and surrounding medium is sensitive to the viscoelastic properties of the layer. A stiff and compact film proportionally damps the resonance overtones to the same extent. In this case, changes in normalized frequency are the same for each overtone. In contrast, for a dissipative non-rigid structure, the propagation of the crystal resonance varies with overtone number n , which results in a decrease in penetration depth with increasing n . It is obvious from Figure 1 that there was a significant variation in the magnitude of the normalized frequency and dissipation for $n = 3, 5$

and 7 upon adsorption of PGM, as previously observed for Bovine Submaxillary gland Mucin (BSM) ¹³. Changes in normalized frequency and dissipation were maximal for $n = 3$ and minimal for $n = 7$, indicating a heterogeneous layer which was more diffuse further from the surface. After PBS rinsing, signal differences between overtones were markedly lower (same dissipation shifts for $n = 3, 5$ and 7), which implies the transition to a more rigid and homogeneous conformation.

In order to get a better understanding of the adsorption process of PGM to the polystyrene-coated QCM crystal, the change in dissipation was plotted versus the frequency shift for the 3rd overtone (Figure 2). Presenting data in this form (*i.e.*, induced energy dissipation per coupled unit mass) enables to directly assess the effect of PGM adsorption on the viscoelastic damping of the crystal resonance and, thus, infer viscoelastic properties of the deposited layer. A low $\Delta D/\Delta f$ ratio indicates a mass uptake without significant dissipation increase, which is characteristic of a fairly rigid film. In contrast, a high $\Delta D/\Delta f$ ratio reveals a soft structure. In our case, a two-phase process of adsorption was observed, corresponding to the transition from a stiff to a less rigid and dissipative film during the course of PGM adsorption. This behavior was quite different from the single-phase adsorption process, depicted by Feiler *et al.* ¹³ for BSM, probably due to structural differences between both types of mucin. In order to deeper investigate such particular behaviour, the composition of the PGM layer was analysed. To this end, the surface of a polystyrene-coated QCM crystal before and after PGM injection was characterized using X-ray photoelectron spectroscopy. Results are displayed in Figures 3a and 3b for C1s and N1s core level spectra, respectively. For the polystyrene-coated crystal, the C1s spectrum was fitted with two contributions. The first peak at 285.0 eV was associated to carbon in polystyrene and C-C bonds due to surface contamination. This peak includes the two C1s components of the polystyrene, cyclic CH₂ and aliphatic CH₂, at 284.8 eV and 285.0 eV, respectively. The second peak, attributed to the shake-up satellite (characteristic of polystyrene), was observed at 291.5 eV. After adsorption of PGM to the polystyrene-coated crystal and rinsing steps (PBS buffer/milliQ-grade water), the intensities of the peaks at 285.0 eV and 291.5 eV decreased (Figure 3a). The attenuation of these signals was caused by coating of the polystyrene surface. Two other C1s contributions were also observed. The peak at 286.5 eV was associated to C-O and/or C-N bonds whereas the one at 288.6 eV was assigned to COOH or CONH compounds. These peaks are representative of chemical groups present in mucins (protein core and carbohydrate side chains). The N1s signal, depicted in Figure 3b, was not detected for bare polystyrene, as expected. After PGM adsorption, it was

composed of one peak at 400.8 eV (Figure 3b), associated to NH₂ and characteristic of nitrogen in C-NH₂ groups of proteins. O1s and S2p signals (traces for the latter) were also observed at 532.6 eV and 164.0 eV (data not shown). We should note that silicon was detected for bare and PGM-coated polystyrene crystals and may be attributed to silane or silica because of ambient contamination or to silicate originating from glass vessels, as previously depicted for polystyrene conditioned or not with champagne ²¹. Table I summarizes the elemental surface composition (in atomic content) of the polystyrene-coated QCM crystal, before and after PGM adsorption. The presence of C-O, C-N, COOH, CONH and sulphur-related species, was detected in significant amounts on the crystal surface exposed to the PGM solution. One can imagine that segments of the PGM protein backbone adsorb on polystyrene, through rearrangement of hydrophobic and hydrophilic domains within the molecule to maximise hydrophobic interactions with the polymer ²². The hydrophilic carbohydrate side chains of mucins are preferentially exposed to the surrounding aqueous medium, leading to an enhanced wettability ³.

Modelling the viscoelastic properties of the PGM layer using the Voigt-based model

For rigid, evenly distributed and sufficiently thin adsorbed films, the linear Sauerbrey relation between adsorbed mass and measured changes in the resonant frequency was demonstrated to hold a good approximation ²³. However, for non-rigid structures, such as here the PGM layer, the Sauerbrey equation underestimates the attached mass (“missing mass effect”), as explained by Voinova *et al.* ²⁴ or Höök *et al.* ¹⁴. To go beyond such modeling, a Voigt-based viscoelastic film model, describing the propagation and the damping of shear-bulk acoustic waves in a single uniform viscoelastic adsorbed film in contact with a semi-infinite bulk Newtonian liquid under no-slip conditions ^{14,24,25}, was used to describe the QCM-D response during PGM adsorption. Frequency and dissipation data were therefore processed to extract physical properties of the PGM layer such as thickness (d), shear viscosity (η_f) and elastic shear modulus (μ_f). The experimental data and the best fit are displayed as Δf and ΔD versus time in Figure 4 for $n = 3, 5$ and 7 . Considering the complex nature of the PGM film, agreement between experimental QCM-D data and predicted values may be considered as good. Figure 5 presents the temporal variations in the thickness (d), the shear viscosity (η_f) and the elastic shear modulus (μ_f), corresponding to the best-fit curves shown in Figure 4. For the PGM-adsorption step, the best fit was obtained for a film represented by a thickness of 15 nm, even though a slight and gradual decrease was observed over the 30-min period. The

shear viscosity (η_f) and the elastic shear modulus (μ_f) were 1.1×10^{-3} Pa.s and 0.3×10^5 Pa, respectively (using a theoretical value of 1400 kg/m^3 for the density of the protein layer²⁶; for the PBS buffer, a density and a dynamic viscosity of 1005 kg/m^3 and 1.2×10^{-3} Pa.s, respectively, were considered). After PBS buffer rinsing, thickness deduced from modeling decreased to 4 nm with a three-fold increase in the shear viscosity ($\eta_f = 2.9 \times 10^{-3}$ Pa.s) and a ten-fold increase in the elastic shear modulus (μ_f in the range from 4×10^5 to 5×10^5 Pa). The increase in shear viscosity and elastic shear modulus, together with the decrease in thickness during PBS buffer rinsing, were consistent with the transition from a soft “hydrogel-like” structure to a compact and stiff film¹⁴.

In order to experimentally validate the thickness obtained using the Voigt-based viscoelastic modeling, crystals were withdrawn from the QCM-D flow chamber after PBS buffer rinsing and analyzed with AFM by performing “scratch” tests (Figure 6). Using this procedure, the PGM layer and the polystyrene layer on the QCM crystal were removed (see the granular structure of gold on the crystal in Figure 6c) and were estimated at 33.15 nm. With the thickness of the polystyrene layer given by the manufacturer at 30 nm, then the thickness of the PGM layer, deduced from such measurements, was 3.15 nm, which was close to the predicted value of 4 nm. As a conclusion, QCM-D, through the Voigt-based viscoelastic modeling, and AFM measurements yielded the same result for the thickness of the PGM layer, as previously depicted for the Fetal Bovine Serum model protein²⁷.

Adhesion of *L. lactis* to the PGM-coated QCM crystal under flow: comparison between IBB477 and MG1820 strains

After PGM adsorption and PBS buffer rinsing, the *L. lactis* cell suspension was introduced in the QCM flow chamber for 120-min duration. QCM-D output parameters (Δf and ΔD) were recorded as a function of time for both IBB477 and MG1820 strains. Results for the PS+PGM surface are displayed in Figures 7a and 7b for the 3rd overtone. Control data obtained on bare polystyrene (PS), *i.e.*, without any injection of PGM solution, are presented in Figures 7c and 7d. We should note that, above the 3rd overtone ($n = 5$ and 7), the general profiles in both Δf and ΔD remained the same, even though a drastic decrease in the absolute values of dissipation and frequency shifts was observed (data not shown).

On the reference surface (PS) without PGM coating, for both strains, frequency shifts sharply increased in the positive direction during the adhesion phase (initial 50 min). However, the frequency shift caused by adhesion of IBB477 was significantly higher than that associated to the control MG1820 (Figure 7c). Above 50 min, the frequency continued to shift in the positive direction, although at much slower rate than during the initial adhesion phase. IBB477 still exhibited a more positive frequency shift than MG1820 (Figure 7c).

To date, few studies have used QCM-D to characterize bacterial adhesion. Shifts in the resonance frequency were previously reported for adhering spores and starved/exponentially grown bacteria (*Bacillus cereus* and *B. subtilis*)²⁰. Differences were also observed between a series of *Streptococcus salivarius* strains possessing or not surface appendages¹⁶. The QCM-D response for mature biofilms was also characterized²⁸. Even though negative shifts in frequency have been depicted^{28,29}, there are now numerous examples of bacterial adhesion resulting in positive frequency shifts^{16,17,20}. Conventional mass-loading theory cannot explain the occurrence of such positive frequency shifts. This means that adhesion of colloid particles to the sensor surface is not as identical to that achieved with molecules. Positive frequency shifts, observed for instance with nylon microparticles³⁰ are rather explained by a particle slip or wobbling on the surface³⁰ and/or in terms of a coupling between two oscillators *via* a small point-contact, which, in contrast to the normal mass-loading theory, may increase the resonance frequency³¹. In this so-called coupled-oscillator theory, further modeled by Pomorska *et al.*³² in liquid using finite element method, resonance frequency is not only dictated by the magnitude of adsorbed mass but also by the stiffness of the bond between the adsorbed mass and the crystal surface. This concept of coupled-oscillator theory was recently applied to *Staphylococcus epidermidis*, highlighting the effect of the stiffness of the bacterium/substratum interface¹⁷. The authors also pointed out the potential antagonist role of EPS excretion in the QCM response (molecular adsorption through the normal mass-loading theory). The positive frequency shifts observed here on bare polystyrene for both strains indicate that *L. lactis* adhered to the sensor surface according to the coupled-oscillator theory rather than the conventional mass-loading theory.

We should note that recent work indicated that frequency shifts are unsuitable for bacterial detection. In fact, Poitras and Tufenkji²⁹ indicated that dissipation could be a better response signal than the frequency for monitoring microbial adhesion. In our case, IBB477 strain yielded a higher dissipation shift than that obtained with MG1820 on PS (Figure 7d).

When *L. lactis* adhesion was monitored with QCM-D on the PGM-coated crystal, the frequency shift for IBB477 remained positive, albeit approximately threefold lower than that observed for bare polystyrene (17.1 ± 2.9 Hz against 44.9 ± 1.2 Hz after the 120-min adhesion period, respectively) (Figure 7a). In contrast, for MG1820, no significant frequency variation was detected (Figure 7a). The dissipation shift for IBB477 was about $18.5 \pm 2.0 \times 10^{-6}$ after 120 min (Figure 7b), which was almost fourfold lower than the value reported for bare polystyrene. For MG1820, as for the frequency signal, no dissipation variation occurred (Figure 7b). This was a first indication of the anti-adhesive effect of adsorbed PGM towards MG1820 and to a lesser extent IBB477.

In order to get a more thorough understanding of QCM-D outputs, as for PGM adsorption, the $\Delta D_{120 \text{ min}}/\Delta f_{120 \text{ min}}$ ratios were calculated for IBB477 and MG1820 adhered to PS and PS+PGM. Results are displayed in Figure 8. When bacteria are attached to the crystal surface, energy dissipation increases, more or less depending on the structure of the cell deposit. The magnitude is greater for flexible and viscoelastic films than for thin rigid ones. In parallel, the number of attached bacteria to PS and PS+PGM surfaces was evaluated, after the 120-min adhesion period and PBS buffer rinsing, by DAPI direct counting using epifluorescence microscopy (Figure 8). Adhesion of IBB477 to bare polystyrene was higher than that achieved with the control MG1820. The resulting cell layer exhibited more viscoelastic properties (*i.e.*, higher $\Delta D/\Delta f$ ratio) (Figure 8). After PGM coating, adhesion level was significantly reduced for both strains (Figure 8), which was related to more rigid structures (lower $\Delta D/\Delta f$ ratios, see Figure 8). This is consistent with anti-adhesive properties of mucin-based coatings³, due to the conjunction of electrostatic, hydrophilic and steric repulsions, which are induced by PGM structural and interfacial complexity. For MG1820, adhesion to PGM was negligible (no significant change in frequency and dissipation, drastic drop in the number of attached bacteria). In our previous study using AFM force spectroscopy at the single cell level, interaction force between MG1820 and PS+PGM was six times inferior to that measured with PS alone, with a low percentage of specific adhesive events³. However, adhesion of IBB477 to PS+PGM was significantly enhanced in comparison with MG1820 (sharp increases in Δf and in the number of attached cells, higher $\Delta D/\Delta f$ ratio, see Figures 7a, 7b and 8).

IV. CONCLUDING REMARKS

The present study used QCM-D for real-time monitoring of PGM adsorption and subsequent adhesion of the model LAB *L. lactis* under flow, with a view of comparing the muco-adhesive properties of two different strains at the entire population level: the IBB477 strain, which was previously shown to exhibit *in vivo* persistence in the rat gastrointestinal tract¹⁸ and the control strain MG1820. The positive frequency shifts observed during bacterial adhesion were attributed to the coupled-oscillator theory, previously described for non-LAB strains^{16,17,20}. The presence of PGM coating strongly reduced bacterial adhesion with respect to the bare substrate, which is in line with the protective function generally ascribed to the mucus layer. However, adhesion of IBB477 to PGM was significantly increased in comparison with MG1820 (sharp increases in Δf and in the number of attached cells, higher $\Delta D/\Delta f$ ratio). Indeed, extracellular proteins with domains predicted to be involved in adhesion to mucus have been described for LAB⁶. These mucus-binding domains (MUB), found exclusively in LAB, are variable in size (100-200 residues per domain) and number (1-15 for a given protein). Among different LAB species, MUB domain-containing proteins are most abundant in lactobacilli, which are the natural inhabitants of the gastrointestinal tract⁶. By contrast, in traditional “domesticated” *L. lactis* strains, the presence of MUB-domain-containing proteins is limited. For instance, *L. lactis* MG1363 (original strain of MG1820) exhibits one single protein (encoded by the gene *llmg_2465*) with only three MUB-domains and no peptide signal, in comparison with *Lactobacillus gasseri* ATCC MUB 33323 which contains thirteen proteins with a number of MUB domains ranging from four to ten⁶. These differences may partly explain the low adhesion of the control strain MG1820 to PGM.

However, Giaouris *et al.*⁷ highlighted the diversity of surface physico-chemical properties among 50 natural *L. lactis* strains isolated from different origins (dairy, vegetal). In the same way, Passerini *et al.*⁸ recently reported the genetic and genomic diversity within a collection of 36 strains (*L. lactis* subsp. *lactis*) isolated from different ecological sources and geographical areas. The authors proposed a new classification based on ecological separation between “domesticated” strains and “environmental” strains, the latter being the main contributors to the genetic diversity within the subspecies. Such diversity may afford an important pool of properties and functionalities. Muco-adhesion was here demonstrated to be a highly variable phenotypic trait among *L. lactis* strains. This valuable characteristic of lactococci may now find issues for medical and food-related applications. To this aim, the

muco-adhesive behaviour of IBB477 (dairy origin) should be more deeply investigated, with a special interest for molecular determinants of the cell wall involved.

Acknowledgements

This work was supported by INRA (CEPIA and MICA Departments) through the doctoral grant of D.T.L. Le (2008-2011). The authors wish to thank Chun Wang and Sandrine Zanna (Laboratoire de Physico-Chimie des Surfaces, Paris, France) for XPS measurements, and Jacek Bardowski and Magdalena Kowalczyk (Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland) for the gift of IBB477 strain and for fruitful and stimulating discussions. Thanks are also due to Marie-Pierre Duviau and Myriam Mercade (LISBP, Toulouse, France) for their technical support.

REFERENCES

- ¹A. C. Ouwehand, P. V. Kirjavainen, M. M. Grönlund, E. Isolauri, and S. J. Salminen, *Int. Dairy J.* **9** (9), 623 (1999).
- ²C. Gusils, V. Morata, and S. González, in *Public Health Microbiology* (2004), Vol. 268, Part VI, pp. 411.
- ³E. Dague, D. T. L. Le, S. Zanna, P. Marcus, P. Loubière, and M. Mercier-Bonin, *Langmuir* **26** (13), 11010 (2010).
- ⁴M. A. McGuckin, S. K. Lindén, P. Sutton, and T. H. Florin, *Nat. Rev. Micro.* **9** (4), 265 (2011).
- ⁵S. M. Finegold, V. L. Sutter, and G. E. Mathisen, *Human Intestinal Microflora in Health and Disease*. (Academic Press, New York, 1983).
- ⁶J. Boekhorst, Q. Helmer, M. Kleerebezem, and R. J. Siezen, *Microbiology* **152** (1), 273 (2006).
- ⁷E. Giaouris, M.-P. Chapot-Chartier, and R. Briandet, *Int. J. Food Microbiol.* **131** (1), 2 (2009).
- ⁸D. Passerini, C. Beltramo, M. Coddeville, Y. Quentin, P. Ritzenthaler, M.-L. Daveran-Mingot, and P. Le Bourgeois, *PLoS ONE* **5** (12), e15306 (2010).
- ⁹P. Norton, R. Le Page, and J. Wells, *Folia Microbiol.* **40** (3), 225 (1995).
- ¹⁰L. Steidler and P. Rottiers, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1072** (1), 176 (2006).
- ¹¹G. Sauerbrey, *Z. Phys.* **155**, 206 (1959).
- ¹²M. Rodahl, F. Hook, C. Fredriksson, C. A. Keller, A. Krozer, P. Brzezinski, M. Voinova, and B. Kasemo, *Faraday Discuss.* **107**, 229 (1997).
- ¹³A. A. Feiler, A. Sahlholm, T. Sandberg, and K. D. Caldwell, *J. Colloid Interface Sci.* **315** (2), 475 (2007).
- ¹⁴F. Höök, B. Kasemo, T. Nylander, C. Fant, K. Sott, and H. Elwing, *Anal. Chem.* **73** (24), 5796 (2001).
- ¹⁵D. Shen, M. Huang, L.-M. Chow, and M. Yang, *Sens. Actuators, B* **77** (3), 664 (2001); J. Vörös, *Biophys. J.* **87** (1), 553 (2004).
- ¹⁶A. L. J. Olsson, H. C. van der Mei, H. J. Busscher, and P. K. Sharma, *Langmuir* **25** (3), 1627 (2009).
- ¹⁷A. L. J. Olsson, H. C. van der Mei, H. J. Busscher, and P. K. Sharma, *J. Colloid Interface Sci.* **357** (1), 135 (2011).
- ¹⁸J. Boguslawska, J. Zycka-Krzyszowska, A. Wilcks, and J. Bardowski, *Appl. Environ. Microbiol.* **75** (19), 6352 (2009).
- ¹⁹J. Elsom, M. I. Lethem, G. D. Rees, and A. C. Hunter, *Biosens. Bioelectron.* **23** (8), 1259 (2008).
- ²⁰A.-C. Olofsson, M. Hermansson, and H. Elwing, *Appl. Environ. Microbiol.* **71** (5), 2705 (2005).
- ²¹V. Aguié-Béghin, Y. Adriaensen, N. Péron, M. Valade, P. Rouxhet, and R. Douillard, *J. Agric. Food Chem.* **57** (21), 10399 (2009).
- ²²L. Shi and K. D. Caldwell, *J. Colloid Interface Sci.* **224** (2), 372 (2000).

- ²³F. Höök, M. Rodahl, P. Brzezinski, and B. Kasemo, *Langmuir* **14** (4), 729 (1998).
- ²⁴M. V. Voinova, M. Jonson, and B. Kasemo, *Biosens. Bioelectron.* **17** (10), 835 (2002).
- ²⁵N.-J. Cho, K. K. Kanazawa, J. S. Glenn, and C. W. Frank, *Anal. Chem.* **79** (18), 7027 (2007).
- ²⁶J. Tsai, R. Taylor, C. Chothia, and M. Gerstein, *J. Mol. Biol.* **290** (1), 253 (1999).
- ²⁷J. Strauss, Y. Liu, and T. Camesano, *J. Miner. Met. Mater. Soc.* **61** (9), 71 (2009).
- ²⁸A. L. Schofield, T. R. Rudd, D. S. Martin, D. G. Fernig, and C. Edwards, *Biosens. Bioelectron.* **23** (3), 407 (2007).
- ²⁹C. Poitras and N. Tufenkji, *Biosens. Bioelectron.* **24** (7), 2137 (2009).
- ³⁰M. Berglin, A. Olsson, and H. Elwing, *Macromol. Biosci.* **8** (5), 410 (2008).
- ³¹G. L. Dybwad, *J. Appl. Phys.* **58** (7), 2789 (1985).
- ³²A. Pomorska, D. Shchukin, R. Hammond, M. A. Cooper, G. Grundmeier, and D. Johannsmann, *Anal. Chem.* **82** (6), 2237 (2010).

TABLE I. Elemental surface composition (content in at. %), determined by XPS for the polystyrene-coated QCM crystal, before and after PGM adsorption. Rinsing with PBS buffer and milliQ-grade water was performed before analysis.

	C-C, C-H	C-O, C-N	COOH, CONH	N	O	S	Si
polystyrene-coated crystal before PGM adsorption	99.7	-	-	-	0.2	-	0.1
polystyrene-coated crystal after PGM adsorption	76.4	4.4	0.8	4.1	10.6	0.2	3.5

FIGURE CAPTIONS

Figure 1. QCM-D measurements of (a) changes in frequency (Δf) and (b) changes in dissipation (ΔD) versus time during adsorption of PGM onto the polystyrene-coated crystal. (I): injection of PBS buffer; (II+III): injection of PGM solution; (IV): rinsing with PBS buffer. The change in frequency was normalized by the overtone number, n , and the data set is indicated in the figure.

Figure 2. Change in dissipation (ΔD) as a function of the frequency shift (Δf) during PGM adsorption to the polystyrene-coated crystal (phase II, as depicted in Figure 1). The steeper gradient of the slope reflects a more viscoelastic PGM layer. Error bar represents SD at the point of change, over three measurements performed with independent PS quartz crystals.

Figure 3. (a) C1s core level spectra and (b) N1s core level spectra recorded by XPS for the polystyrene-coated crystal before and after PGM adsorption (PS and PS+PGM, respectively).

Figure 4. Δf and ΔD versus time at $n=3$, $n=5$ and $n=7$ for QCM-D data (phases II, III and IV, as depicted in Figure 1). The best fit between the Voigt-based viscoelastic model (lines, as obtained using Qtools, Q-Sense) and the experimental data are shown as: $\Delta f_{n=3}$ – right triangles, $\Delta D_{n=3}$ – left triangles, $\Delta f_{n=5}$ – down triangles, $\Delta D_{n=5}$ – up triangles, $\Delta f_{n=7}$ – circles, $\Delta D_{n=7}$ – squares.

Figure 5. Time variation of the change in thickness (circles), shear viscosity (squares) and elastic shear modulus (diamonds), obtained from the fit shown in Figure 4. Phases II, III and IV are depicted in Figure 1.

Figure 6. AFM height (a) and deflection (c) images of the PGM layer formed on the polystyrene-coated crystal, after the scratch test with (b) cross-section.

Figure 7. (a, c) Changes in frequency (Δf) and (b, d) dissipation (ΔD) versus time at the 3rd overtone during adhesion of *L. lactis* IBB477 (squares) and MG1820 (circles) to the polystyrene-coated crystal with PGM layer (a, b) and without PGM layer (c, d). Error bars represent SD over three measurements with independent quartz crystals and separately grown *L. lactis* cultures.

Figure 8. Number of attached bacteria (bars) on the polystyrene-coated crystal with and without PGM layer (PS+PGM and PS, respectively) for MG1820 and IBB477 strains, as obtained using epifluorescence microscopy over at least 15 fields of view for each condition.

Representative images are shown (DAPI staining). Ratios of dissipation shift versus frequency shift (symbols) after the 120-min adhesion phase ($\Delta D/\Delta f$) for both strains are also indicated. The data are means \pm standard deviations from three experiments performed with independent quartz crystals and separately grown *L. lactis* cultures.

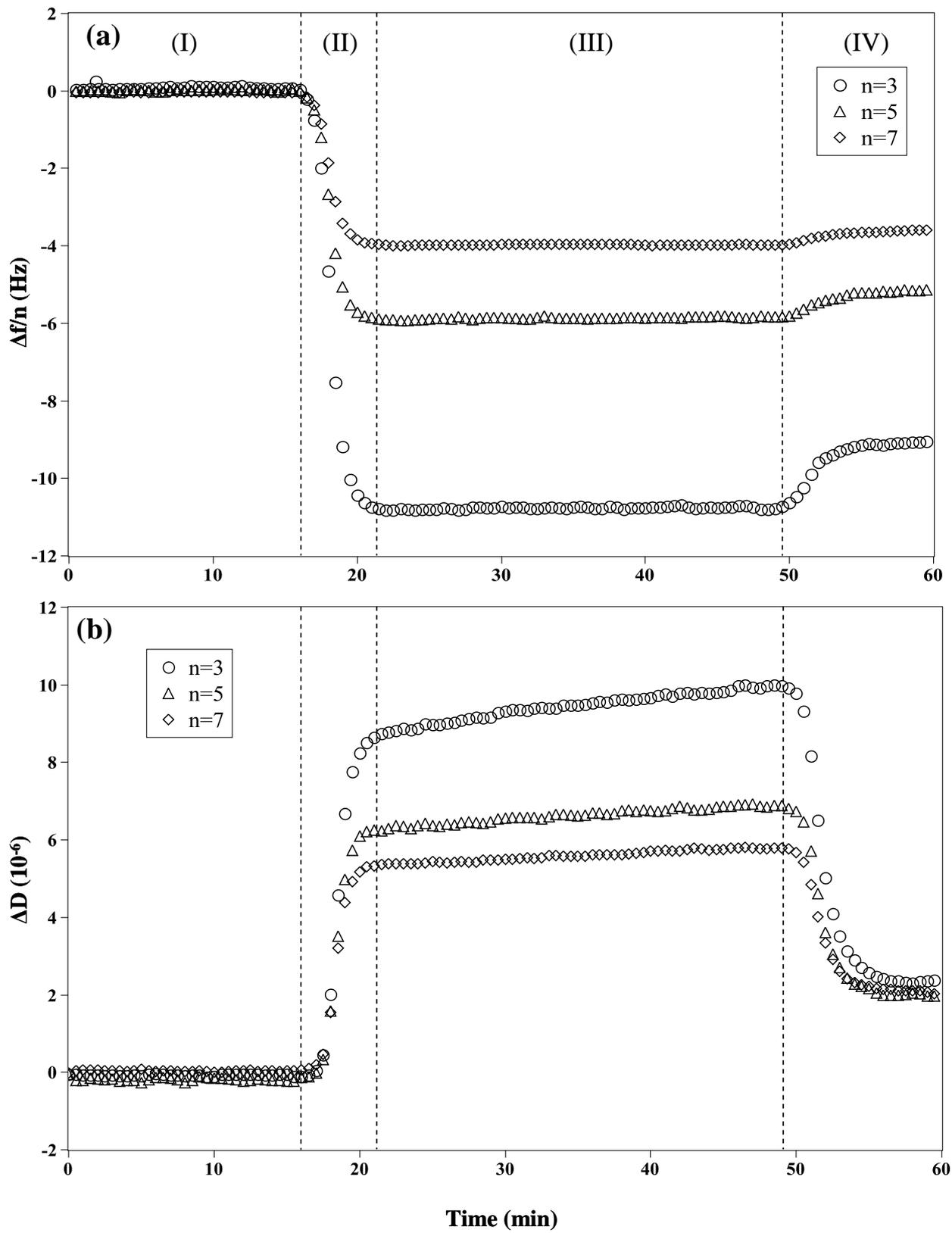


Figure 1

D. T. L. Le *et al.*

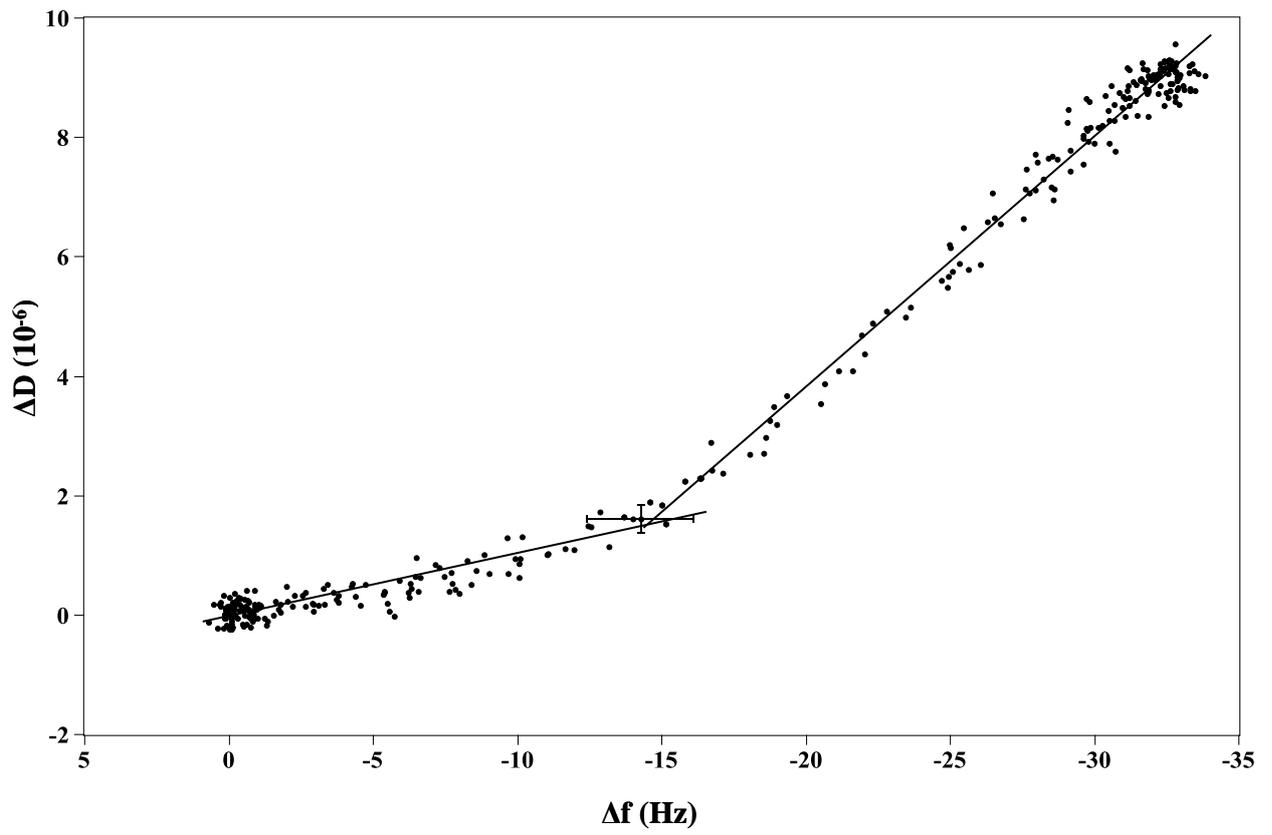


Figure 2

D. T. L. Le *et al.*

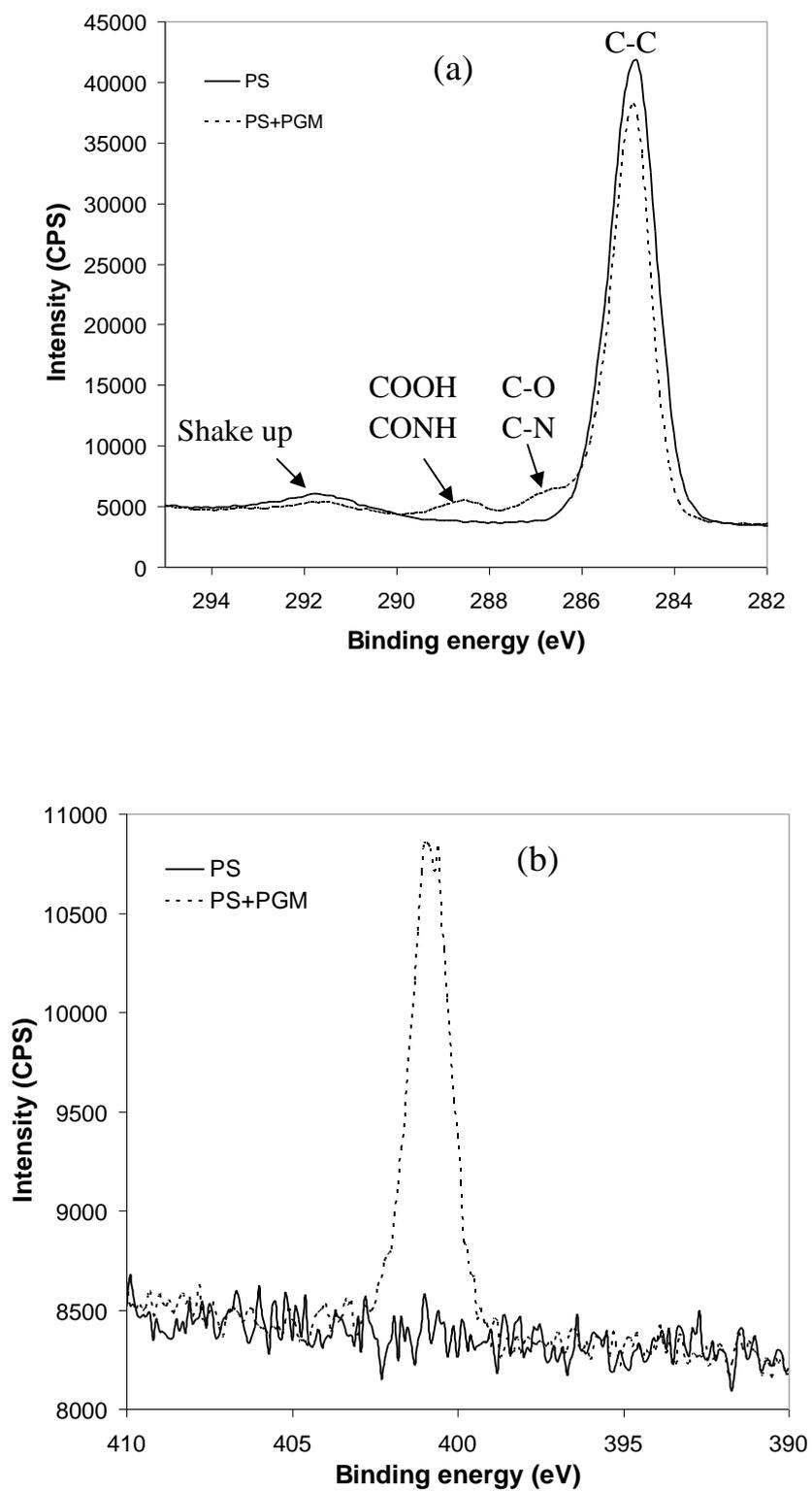


Figure 3

D. T. L. Le *et al.*

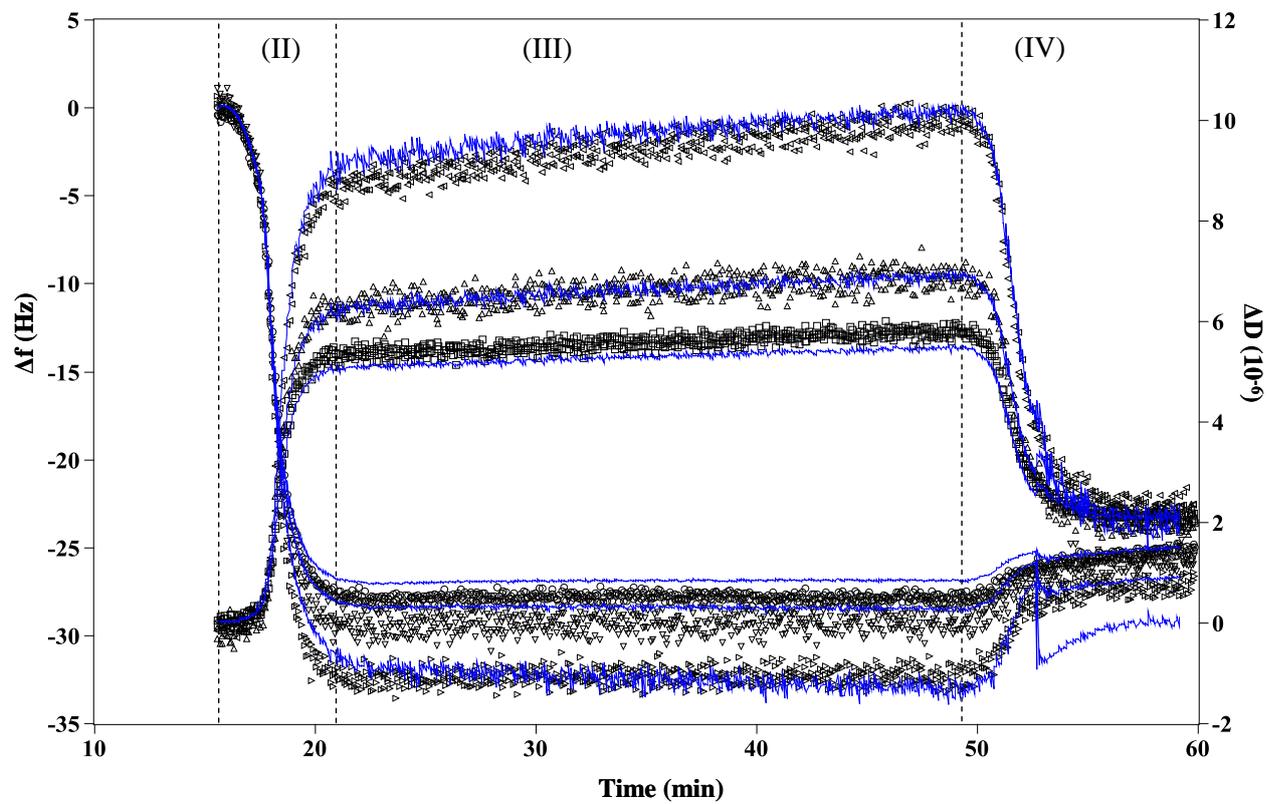


Figure 4

D. T. L. Le *et al.*

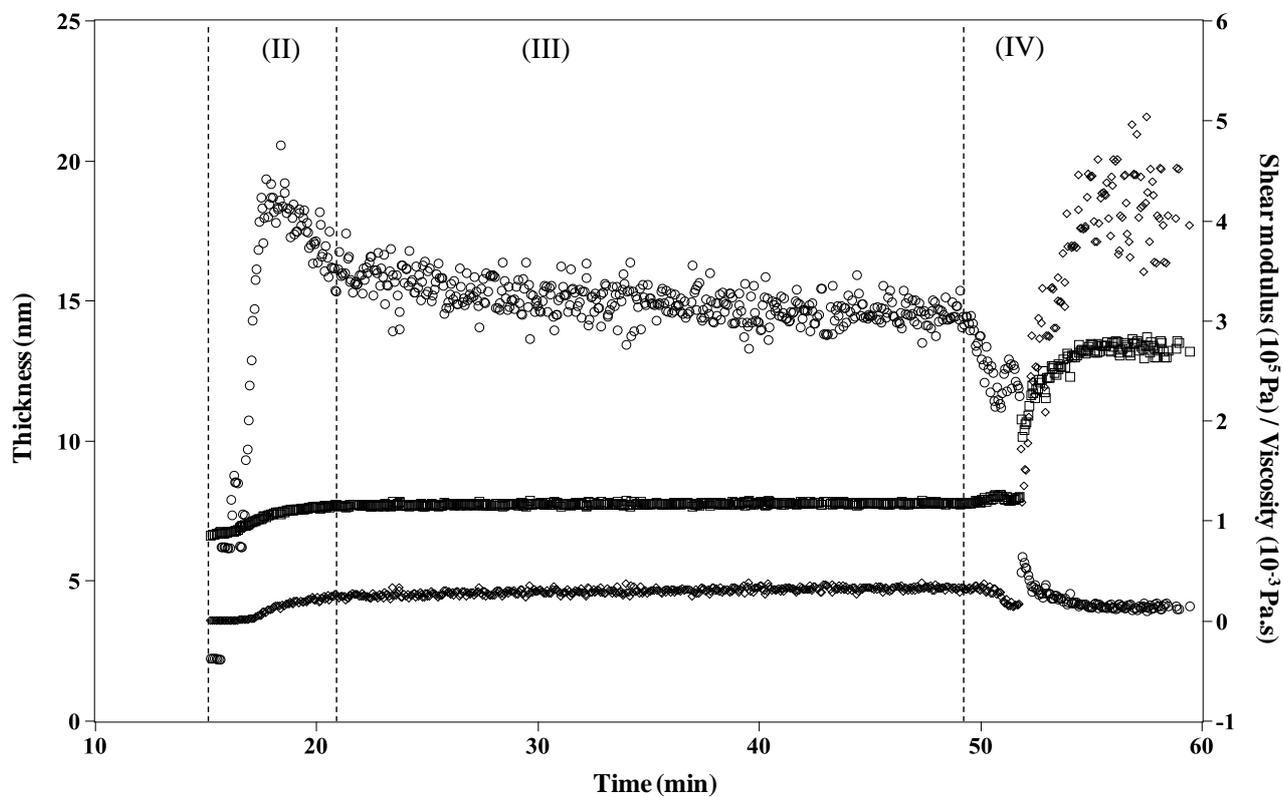


Figure 5

D. T. L. Le *et al.*

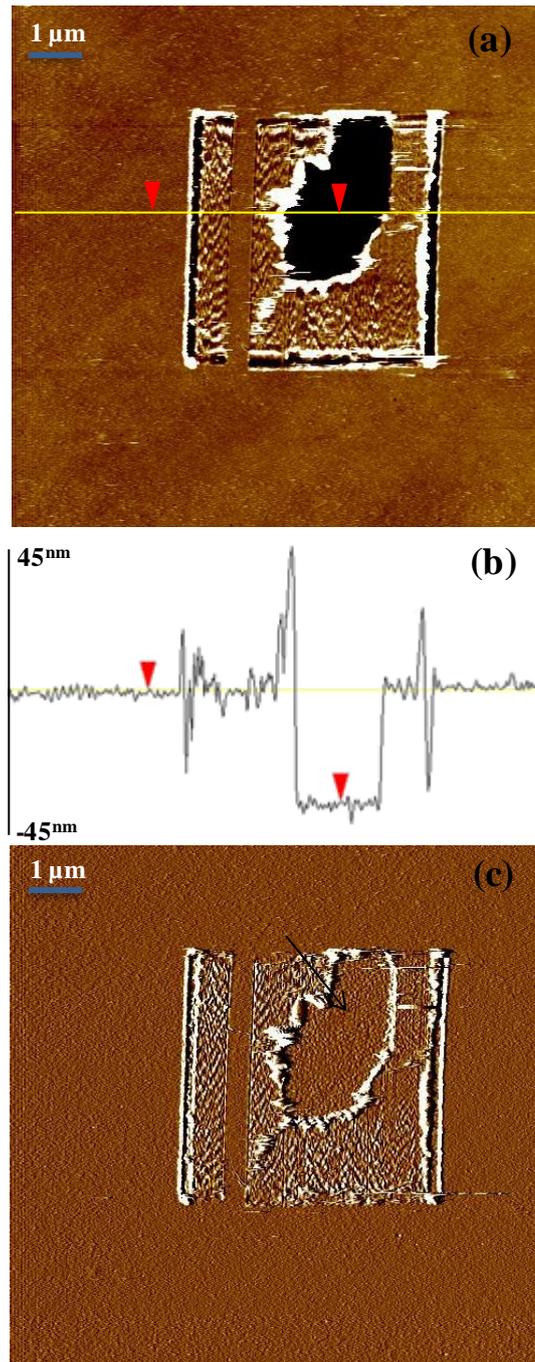


Figure 6

D. T. L. Le *et al.*

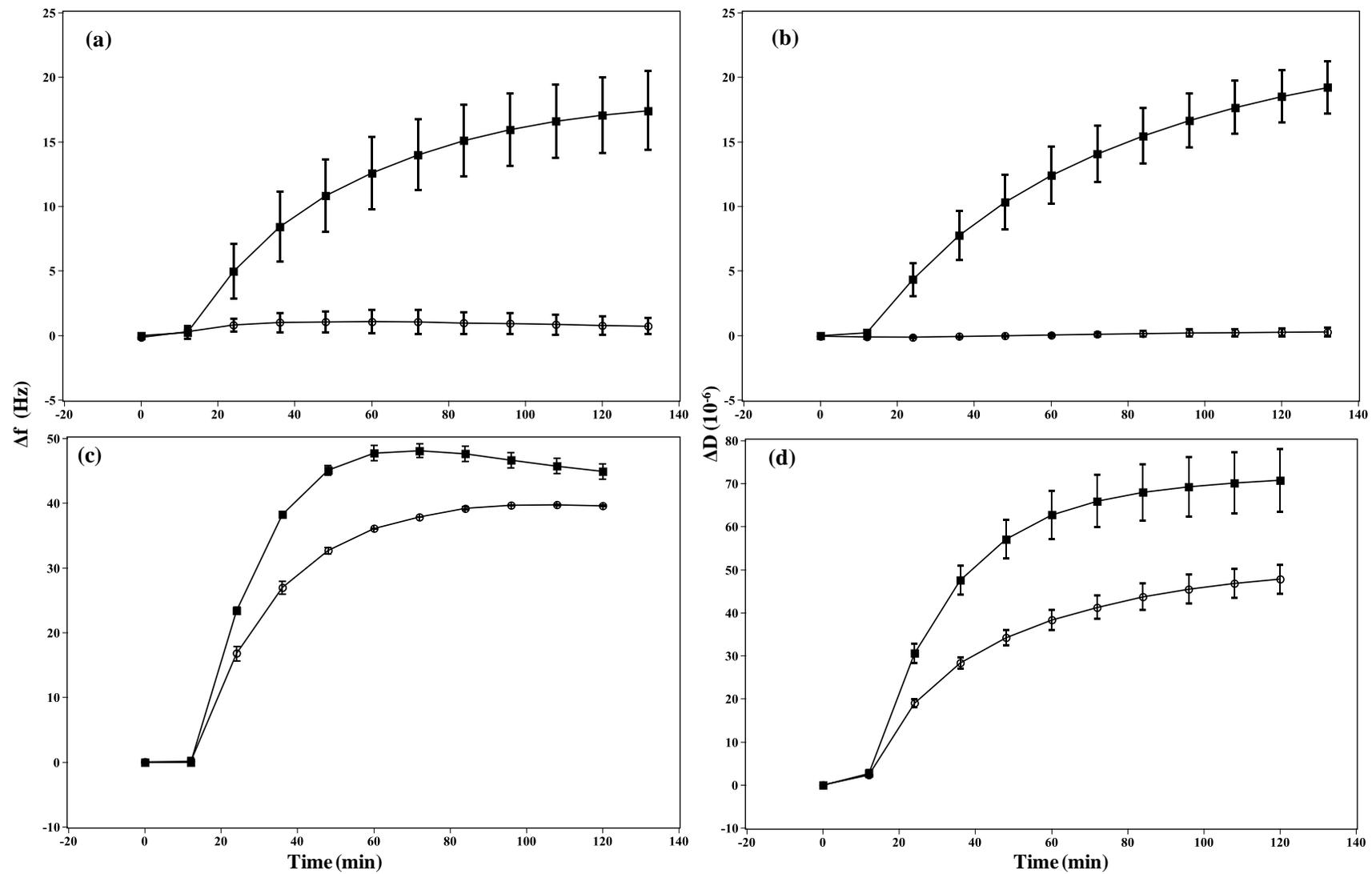


Figure 7

D. T. L. Le *et al.*

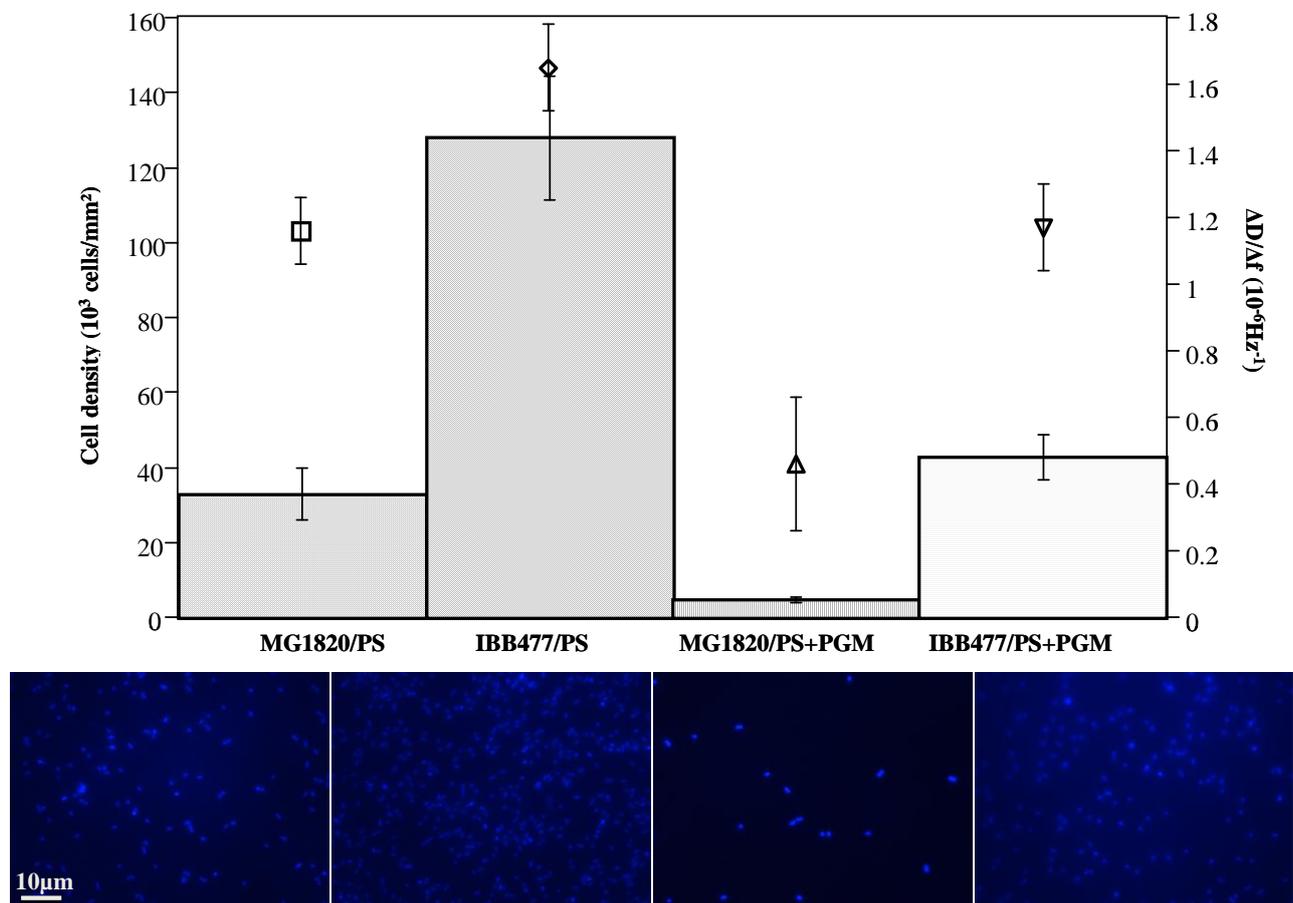


Figure 8

D. T. L. Le *et al.*

2.2. Détachement de *L. lactis* sous cisaillement contrôlé : modélisation de la force d'adhésion à la mucine PGM

Objectif : en complément de la QCM-D, cette étude se focalise sur la quantification des interactions entre *L. lactis* et PGM à l'échelle de l'ensemble de la population bactérienne, en conditions hydrodynamiques contrôlées (écoulement laminaire) avec la mise en œuvre de la chambre à écoulement cisailé. L'objectif ici est de relier les échelles cellule unique vs. population entière, pour *in fine* modéliser le processus d'interaction *L. lactis*/PGM sur les souches IBB477 et MG1820.

Matériels et méthodes : la chambre à écoulement cisailé a été mise en œuvre pour suivre *in situ* le détachement des bactéries *L. lactis* adhérentes, dans des conditions d'écoulement laminaire (nombre de Reynolds maximal de 560). L'observation directe du comportement bio-adhésif des bactéries par microscopie optique, sous cisaillement contrôlé à différents paliers de débit de circulation, combinée au traitement ultérieur des images obtenues, permet d'accéder à plusieurs grandeurs caractéristiques, telles que la contrainte de cisaillement nécessaire au détachement de 50 % des bactéries initialement attachées. En parallèle, les forces d'adhésion entre IBB477 et MG1820 et la couche de PGM ont été prédites par l'application d'un modèle mécanistique, basé sur l'équilibre des forces hydrodynamiques et des moments exercés sur la bactérie adhérente, soumise à l'écoulement cisailé.

Résultats : la présence de la couche de PGM réduit l'adhésion des bactéries par rapport à la surface vierge. Cependant, l'adhésion de la souche IBB477 à PGM est significativement plus importante que celle obtenue avec MG1820 (*i.e.*, plus faible pourcentage de bactéries détachées sur toute la gamme de contraintes de cisaillement appliquées). La force d'adhésion modélisée atteint $0,16 \pm 0,18$ nN et $2,06 \pm 1,46$ nN pour MG1820 et IBB477, respectivement. Ces niveaux de force ont ensuite été comparés aux valeurs mesurées par AFM, ce qui constitue, à notre connaissance, la première étude d'intégration des données provenant de méthodes directe (AFM) et indirecte (chambre à écoulement). Contrairement à la souche MG1820 (même ordre de grandeur selon les deux approches), la force d'adhésion modélisée pour IBB477 est dix fois supérieure à celle mesurée par AFM ($0,22 \pm 0,05$ nN), probablement en lien avec la contribution significative des événements adhésifs spécifiques. La densité de liaisons pour IBB477 a ensuite été estimée (valeur moyenne de 172×10^{12} liaisons/m²).

**Detachment of *Lactococcus lactis* from PGM-coated surfaces under
controlled shear flow: modelling of the adhesion force**

Doan Thanh Lam Le ^{1,2,3,4,5,6}, **Marie-Pierre Duviau** ^{1,2,3}, **Philippe Schmitz** ^{1,2,3}, **Pascal Loubière** ^{1,2,3}, **Etienne Dague** ^{4,5,6}, **Muriel Mercier-Bonin** ^{1,2,3*}

¹ Université de Toulouse; INSA, UPS, INP; LISBP, 135 Avenue de Rangueil, F-31077 Toulouse, France

² INRA, UMR792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400 Toulouse, France

³ CNRS, UMR5504, F-31400 Toulouse, France

⁴ CNRS ; LAAS ; 7 avenue du colonel Roche, F-31077 Toulouse, France

⁵ Université de Toulouse ; UPS, INSA, INP, ISAE ; LAAS ; F-31077 Toulouse, France

⁶ Université de Toulouse ; UPS, INSA, INP, ISAE; UT1, UTM, LAAS, ITAV ; F-31077 Toulouse cedex 4, France

Corresponding author:

Muriel Mercier-Bonin: Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, INSA, 135 avenue de Rangueil, 31077 Toulouse cedex 4, France.

Tel: +33 (0) 561 559 419

Fax: +33 (0) 561 559 400

E-mail: Muriel.Mercier-Bonin@insa-toulouse.fr

ABSTRACT

The present work was devoted to probe, under well-controlled laminar flow conditions and at the entire population level, interactions between *Lactococcus lactis*, the lactic acid bacteria model, and mucins, with a special interest for the model mucin PGM (“Pig Gastric Mucin”). To this end, shear-flow induced *L. lactis* detachment experiments from bare or PGM-coated polystyrene were performed in a specially-designed shear stress flow chamber, with a view of comparing the muco-adhesive properties of two different strains: the IBB477 strain, which was previously shown to exhibit *in vivo* persistence in the rat gastrointestinal tract and the control strain MG1820. Adhesion force between both strains and PGM coating was quantified. To this aim, detachment results were combined with a theoretical modelling, based on the balance of hydrodynamic forces and torque exerted over a spherical-shaped bacterium. The wall shear stress, required to remove 50 % of the bacteria initially attached to PGM, was determined. On this basis, an adhesion force of 0.16 ± 0.18 nN and 2.06 ± 1.46 nN was obtained for MG1820 and IBB477, respectively. Such predicted force levels were compared to AFM measurements, which is to the best of our knowledge the first attempt to integrate data derived from direct (AFM) and indirect (flow chamber) methods, probing adhesion at multi-scale (single-cell *vs.* entire population). Contrary to MG1820 strain, the modeled adhesion force for IBB477 was tenfold higher than that measured with AFM, probably in line with the effective contribution of specific adhesive events. The density of bonds involved was estimated.

Keywords: *Lactococcus lactis*, mucin, shear stress flow chamber, modeling, adhesion force, bond density

1. INTRODUCTION

In the gastrointestinal tract (GIT), the mucosal epithelium displays highly specialized functions, like digestion and absorption of ingested food, and elimination of undigested food, microorganisms and microbial-related products. In order to protect the mucosa, the host produces a thick layer of mucus covering the stomach, the small intestine and the large intestine [1, 2]. This protective barrier, which constitutes the first line of defense against physical and chemical injury [3], consists in two adjacent layers: a thin inner layer, which is sterile and physically difficult to dislodge, and a thicker outer one, which is not sterile and more diffuse [4, 5]. The major component of mucus is mucins that are responsible for its viscous, elastic gel-like and biological properties. The membrane-bound and secreted mucins are large glycoproteins exhibiting a protein backbone structure, linked to a complex array of hydrophilic oligosaccharide side-chains [6], representing potential ligands for microbial adhesins and/or energy source for commensal microorganisms in the outer mucus layer [7]. In this framework, physical interaction with the mucus layer, and especially mucins, is undoubtedly an important trait in understanding and improving the gut ecology through the balance of putative beneficial over pathogenic bacteria. To date, direct adhesion forces to mucins remain poorly investigated, especially for beneficial microorganisms (probiotics, technological microbiota), like Lactic Acid Bacteria (LAB). *Lactococcus lactis*, generally considered as the model for LAB, is widely used as a starter in manufacturing cheese and other fermented dairy products. It is not usually considered as a normal element of the human intestinal microbiota, even though it was sporadically isolated from feces of many different groups of humans [8]. Indeed, the presence of mucus-binding (MUB) domain-containing proteins has been highlighted in lactococci, using an *in silico* analysis [9]. Furthermore, the biodiversity among a large panel of natural *L. lactis* strains in terms of surface physico-chemical properties [10] and ecological niches [11], may afford an important pool of functionalities for food (probiotics) and health-related applications (mucosal vaccine [12], therapeutic drug delivery [13]), both potentially involving muco-adhesion. In our previous works ([14] and recently published results, see *parts III - 1.2 and 1.3*⁴), the use of AFM force spectroscopy provided new insights into the interaction mechanisms between *L. lactis* and the model mucin PGM (“Pig Gastric Mucin”), using two different strains: the IBB477 strain,

⁴ Ce renvoi en italiques fait référence aux différents chapitres de la partie Résultats du présent manuscrit.

which was previously shown to exhibit *in vivo* persistence in the rat gastrointestinal tract [15] and the control strain MG1820. Interaction forces were directly quantified at nanoscale between an AFM tip functionalized with living *L. lactis* cells (“lacto-probe”) and PGM-coated polystyrene. Both non-specific (showing no extension before rupture) and specific forces (ligand/receptor bonding) were shown to be involved in *L. lactis* adhesion to PGM. A higher percentage of specific adhesive events was observed for IBB477 (20 %) compared to the control strain (5 %), probably in line with its *in vivo* persistence. Blocking assays with free PGM and O-glycans demonstrated that oligosaccharides played a major but not exclusive role in interactions between *L. lactis* and PGM. Moreover, the biological interactions were, for the first time with living cell probes on mucins, characterized in terms of kinetic dissociation/association constants (K_{off} and K_{on}). Varying the loading rate and the contact time allowed K_{off} and K_{on} to be estimated, respectively. For both strains, the K_{on} value was identical ($3.3 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). The K_{off} parameter, only evaluated for IBB477, was equal to 0.46 s^{-1} , which is consistent with literature data reported for sugar/protein interactions.

In continuity with our previous works on AFM force spectroscopy at the single-cell scale ([14] and recently published results, see *parts III-1.2 and 1.3*), *L. lactis*/PGM interactions were probed in the present contribution at the entire population level, using a shear stress flow chamber under well-controlled hydrodynamics. Such device, introduced several decades ago [16], has turned out to be powerful for studying microbial adhesion to surfaces [17, 18]. With the aid of optical microscopy, ultra-long-working-distance objectives, image analysis and controlled hydrodynamics, real-time monitoring of interactions between microorganisms and solid surfaces can be achieved *in situ* (*i.e.*, no air-liquid interface). Adhesion is accurately quantified taking into account not only physico-chemical and biological conditions but also heterogeneities within the microbial population [19]. Related studies generally focused on the influence of physico-chemical parameters such as pH [20], ionic strength [21] or surface chemistry [22]. For instance, shear-induced detachment of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in adhesive contact with abiotic surfaces (glass, polymers, stainless steel) was successfully evaluated [23, 24].

In this framework, the present work was dedicated to the first *in situ* characterization of the relationship between hydrodynamics (laminar flow conditions) and *L. lactis* adhesion to PGM at multicellular level. In line with our previous results ([14] and recently published results, see *parts III – 1.2 and 1.3*), IBB477 and MG1820 strains were chosen as target bacteria. Shear-

flow induced detachment of *L. lactis* from PGM-coated polystyrene (PS+PGM) was performed under given environmental conditions (pH, ionic strength), using a homemade dedicated set-up, equipped with a shear stress flow chamber. In parallel, control experiments were carried out on bare polystyrene (PS). The PGM coating, prepared according to previously described procedures [14], was carefully controlled (thickness, structure, composition). *L. lactis* bacteria were put in adhesive contact with the PGM-coated polystyrene plate, allowing specific and non-specific interactions to spontaneously form between the cell wall and the biomimetic PGM-based surface. The flow chamber (inlet and outlet conditions, chamber geometry) was also properly designed in order to establish a fully developed laminar two-dimensional Poiseuille flow and to ensure uniform flow conditions in the observation area [19]. Such design then allowed quantitative reproducible measurements to be made between *L. lactis* and the PGM-coated polystyrene by applying a known uniform wall shear stress under conditions of laminar flow. This controlled shear flow produced hydrodynamic forces and torque which could detach bacteria into the bulk medium or roll them along the surface. Forces and torque of different magnitudes were obtained by varying the flow rate. Results were interpreted in terms of detachment profiles, *i.e.* the ratio of the surface coverage by bacteria to the initial surface coverage versus the wall shear stress applied. Physico-chemical properties of both the solid surface (PS+PGM *vs.* PS) and the bacteria were used to support detachment results and to establish differences between the muco-adhesive properties of IBB477 and MG1820 strains towards the model mucin PGM. In order to determine the adhesion force between *L. lactis* and PGM coating, shear-flow induced detachment experiments were combined with an analytical modeling, first developed by Lorthois *et al.* [25] and based here on the balance of hydrodynamic forces and torque exerted over a spherical-shaped bacterium. The comparison with AFM-based force measurements for IBB477 strain allowed determining, for the first time, the density of bonds involved in the molecular recognition between *L. lactis* and PGM, probably mediated by specific protein/sugar interactions, as previously depicted (recently published results, see *part III-1.3*).

2. THEORETICAL FRAMEWORK FOR MODELING THE ADHESION FORCE

In order to interpret the flow chamber-related experimental results in terms of the net adhesion force between *L. lactis* bacteria and PGM coating, it is necessary to determine the relationship between net adhesion force and wall shear stress at detachment. To this end, the

hydrodynamic forces and torque exerted by fluid flow on bacteria have to be known. Moreover, the contact area between the bacteria and the flat surface must be estimated. A model was proposed by Lorthois *et al.* [25] to quantify the net adhesion force of fibrin-coated spherical latex beads to fibrin-coated flat surface. The same theoretical approach was then used [19, 26, 27] to evaluate the adhesion force between the couples *S. cerevisiae* yeast cells/polystyrene, functionalized microbeads/protein-coated stainless steel and spores/stainless steel, respectively. In the present paper, this modeling was also applied, assuming that *L. lactis* bacteria are spheres of radius r . Thus, the contact area is a circular disc defined by its radius a . To determine the radius of the contact area, several assumptions have to be formulated. Firstly, the bacteria surface must be considered as rigid so that no deformation occurs. Secondly, the existence of bonds between the substratum and the cell wall defines the contact area, *i.e.* the area where such bonds are present [28-30]. These two assumptions will be developed in the section “Results and Discussion”. Thirdly, since the thickness of PGM coating d ($d = 3.4$ nm [14]) is of the same order of magnitude as the thickness of the macromolecular meshwork (ℓ_0) binding the bacteria to the substratum (this point will be further discussed), the characteristic thickness (ℓ) is defined as follows:

$$\ell = \ell_0 + d \quad (1)$$

Therefore, as shown in Figure 1, we have:

$$r^2 = a^2 + (r - \ell)^2 \quad (2)$$

As ℓ is negligible compared to r , we obtain:

$$a = \sqrt{2 \ell r} \quad (3)$$

Such a simplification, first introduced by Lorthois *et al.* [25] for latex microbeads functionalized with fibrin, was more recently considered by Mercier-Bonin *et al.* [19] for *Bacillus* spores.

Finally, using the classical expression of hydrodynamic drag, torque at sphere center, and lift in the ideal case of a laminar infinite linear shear flow over a single spherical particle in contact with an infinite plane wall at rest [31, 32], Newton’s second law gives [25]:

$$\|F_{ad}\| \cos \alpha = 32.0 r^2 \tau_w \quad (4)$$

$$\|F_{ad}\| a \sin \alpha = 43.9 r^3 \tau_w \quad (5)$$

In these expressions, $\|F_{ad}\|$ denotes the magnitude of the net adhesion force, τ_w corresponds to the wall shear stress and α is the angle which defines the direction of deformation of the material constituting the sticking layer (see Figure 1). It can be noticed that Equations (4)-(5) still hold in the case of the three-dimensional laminar flow past an array of uniformly distributed spheres that are attached to the bottom plate of a parallel plate flow channel if the ratio of r to the height of the flow channel is less than $1/15$ and if the interparticular distance is greater than $5r$ [33]. Both conditions were fulfilled in our experiments.

Eliminating a between these two relationships leads to:

$$\tau_w = \frac{\|F_{ad}\|}{r^2 \sqrt{1024 + 964 \frac{r}{\ell}}} \quad (6)$$

Thus, the magnitude of the net adhesion force can be determined from the experimental measurement of the wall shear stress required to remove 50 % of the initially attached bacteria, denoted $\tau_{w50\%}$, using the following equation:

$$\|F_{ad}\| = \tau_{w50\%} r^2 \sqrt{1024 + 964 \frac{r}{\ell}} \quad (7)$$

3. MATERIALS AND METHODS

3.1. Bacterial strains, growth conditions and preparation of suspensions

L. lactis subsp. *cremoris* strains IBB477 and MG1820 were used throughout this study. IBB477 was originally isolated from samples of Polish artisanal dairy products [15]. Bacterial stock cultures were kept at -80 °C in M17 broth (Oxoid), containing 2 % (w/v) lactose and 20 % (v/v) glycerol. Bacteria were first subcultured at 30 °C in M17-lactose (2 % (w/v)) medium. This preculture was then used to inoculate a 500 mL-flask containing 100 mL of M17-lactose (2 % (w/v)) broth, which was incubated overnight at 30 °C until the early stationary phase was reached (optical density of 5.0 at a wavelength of 580 nm, which corresponded to 2.5×10^9 CFU/mL, as determined by plating). Cells were harvested by centrifugation (4000 rpm, 10 min and room temperature) and washed twice with milliQ-grade

water or PBS buffer, depending on further experiments to be performed (AFM and shear stress flow chamber, respectively).

3.2. Preparation of the PGM-coated polystyrene surfaces

The mucin starting material was commercially available as a lyophilized powder (Sigma M1778). Partially purified type III mucin from porcine stomach, thereafter referred to as PGM (“Pig Gastric Mucin”), was dissolved in phosphate buffered saline (PBS) at pH=7.5 at a final concentration of 10 mg/mL. The solutions were prepared just before use.

Polystyrene, provided by Arias (Toulouse, France), was used as the substratum in the form of rectangular coupons (25.2 mm x 6.3 mm x 2.0 mm). Coupons were immersed in liquid detergent RBS 25 2 % (v/v) (Traitements Chimiques de Surfaces, Frelinghien, France) at 50°C for 15 minutes, rinsed in five successive baths of tap water at 50°C and five successive baths of tap water at room temperature, rinsed with copious amounts of MilliQ-grade water (50°C and room temperature) and finally air-dried for 15 min under a vertical flow hood (Cytosafe 2000, Faster, Italy). Surfaces were either used immediately for the following steps or stored in a desiccator at room temperature until use.

PGM adsorption onto polystyrene was performed as previously described with slight modifications [14]. Briefly, polystyrene (PS) substrata, prepared according to the above procedure, were exposed overnight to a 10 mg/mL PGM solution in PBS pH=7.5 at 4 °C, under gentle agitation. After incubation, surfaces were copiously rinsed to remove loosely bound material using, in sequence, PBS buffer and MilliQ-grade water and finally air-dried under a vertical flow hood (Cytosafe 2000, Faster, Italy).

3.3. Characterization of nanomechanical properties of *L. lactis* by AFM

L. lactis cells (OD_{580nm} of 5, corresponding to 2.5 x 10⁹ CFU/mL) were first immobilized by mechanical trapping into a porous polymeric membrane, with a pore size close to the bacterial cell size (about 0.8-µm diameter) [34]. The membrane was then transferred into a Petri dish containing milliQ-grade water and gently rinsed to remove non-immobilized cells. The sample was quickly dried at the bottom side and attached to a steel sample holder which in turn was mounted onto the scanner, ready for use.

Atomic Force Microscopy measurements were made at room temperature in milliQ-grade water to avoid any modification of the cell wall due to desiccation, using a commercial microscope (Nanoscope II, Veeco Metrology Group, Santa Barbara, CA, USA). Topography images were taken under the constant-deflection contact mode, using oxide-sharpened microfabricated Si₃N₄ cantilevers (Veeco Metrology Group) with a typical radius of curvature of 15 nm and a spring constant of 0.02 N.m⁻¹. The applied force was kept as low as possible (0.5-1 nN) and the scan rate was 4–6 Hz. Surface roughness analysis was performed through the power spectral density of the fast Fourier transform of the height images using the commercial AFM software (Veeco Metrology Group). Nanomechanical properties were mapped by recording force-volume images consisting of arrays of 32 x 32 force curves, in parallel with topography images. The maximum applied force was kept at 1 nN. Elasticity maps and histograms were generated by analyzing the force curves according to the Hertz theory for elastic media [35], considering a conical tip geometry, as follows:

$$F = \frac{2E \tan \alpha'}{\pi(1-\nu^2)} \delta^2 \quad (8)$$

where F is the force, d the indentation depth, E the Young modulus, ν the Poisson coefficient and α' the semi-top angle of the tip. A program developed for soft materials [36, 37] in Fortran C++ (Compaq Visual Fortran V.6.6, Compaq Computer Corp., Houston, TX, USA) was adapted and used for fitting experimental force curves with modeling. More details on data processing can be found elsewhere [36, 38].

3.4. *L. lactis* bacteria detachment experiments in the shear stress flow chamber

The effect of PGM coating on *L. lactis* adhesion was evaluated *in vitro* by performing shear flow-induced detachment experiments on sessile bacteria, in a shear stress flow chamber, under laminar flow conditions.

Bare or PGM-coated polystyrene coupons (PS and PS+PGM, respectively) were subjected to shear flow-induced detachment experiments for IBB477 and MG1820 strains, at room temperature, according to the procedure previously described for *S. cerevisiae* yeast cells [24] and *Bacillus* spores [19], with some modifications on the type of flow chamber used. A schematic representation of the experimental set-up is presented in Figure 2A. Details

concerning the flow chamber design and assembling are also given in Figure 2B. Removal of attached bacteria was analyzed in a rectangular flow channel (12-mm width and 200- μm thickness). The flow chamber also comprised a specially-designed diverging upstream channel (Figure 2B), in order to ensure a uniform flow at the inlet of the rectangular part [19]. In the observation area where bacteria are deposited, *i.e.* downstream the entrance region and in the central region of the flow channel, wall shear stress τ_w is given by:

$$\tau_w = \frac{3\mu Q}{4h^2l} \quad (9)$$

where μ is the fluid dynamic viscosity (Pa.s), Q ($\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$) is the flow rate, l and h are respectively the channel half-width and half-thickness (m).

The Reynolds number Re is given by the following equation:

$$Re = \frac{Q}{2lv'} \quad (10)$$

where v' is the fluid kinematic viscosity ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$).

Prior to each detachment experiment, the flow chamber and all tubes were filled with PBS buffer, while care was taken to remove air bubbles from the system. 700 μL of the cell suspension ($OD_{580\text{nm}}$ of 0.3, corresponding to 1.5×10^8 CFU/mL) were slowly injected into the flow chamber and allowed to attach to the solid surface (PS or PS+PGM) under static conditions for 3 hours. Images, collected using the reflection mode of an optical microscope (Nikon Eclipse LV100) equipped with a 40x ultra-long working distance objective, were recorded by a camera (digital STGHT DS-2MBW, Nikon) and the NIS-Elements F3.0 video acquisition software. The field of view was 144 μm by 108 μm with a resolution of 0.09 μm per pixel. Owing to our previous results on velocity field in the flow chamber and uniform flow conditions [19], special care was taken to properly choose the observation area. Images were analyzed for estimating the percentage of the surface occupied by attached cells with the free software Macbiophotonics ImageJ (www.macbiophotonics.ca) and the Matlab software (Mathworks Inc., USA).

After the 3-h adhesion step (initial surface coverage denoted A_i), rinsing with PBS buffer was achieved at a low flow rate of $0.002 \text{ mL} \cdot \text{s}^{-1}$ (corresponding to a wall shear stress of about 0.03 Pa) in order to eliminate loosely adhered bacteria. The percentage of remaining attached cells was thereafter referred as to A_0 . We should note that the A_0 value was in the range 1 % - 3 %

of the total surface area, so that any interactions between neighboring bacteria were considered as minimal. Laminar flow of PBS buffer was then imposed, with a stepwise increase in the flow rate (maximal value of $6.7 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$), with 3-min step duration. Flow rates ranging from 0.002 to $0.3 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$ were generated by gravity, controlling through a toothed rack the height of a constant head vessel located upstream of the chamber (Figure 2A). Higher flow rates were obtained using a gear pump (Ismatec, Fisher Bioblock Scientific). The maximal Reynolds number was equal to 560 (laminar conditions). The wall shear stress τ_w was in the range 0–80 Pa.

At the end of each step, the surface coverage by attached bacteria (A) was estimated. The detachment profile, representing the ratio A/A_0 as a function of the wall shear stress τ_w , was plotted. Each condition (PS vs. PS+PGM) was performed in triplicate for IBB477 and MG1820 strains with independent coupons and separately grown cultures.

4. RESULTS AND DISCUSSION

The shear stress flow chamber was implemented for monitoring and comparing the shear-flow induced detachment of IBB477 and MG1820 strains, in order to establish differences between their muco-adhesive properties under well-controlled laminar flow conditions, at the entire bacterial population level.

4.1. Shear-flow induced detachment of *L. lactis* from bare and PGM-coated polystyrene: comparison between IBB477 and MG1820 strains

The respective roles of PGM coating and *L. lactis* strain (IBB477 vs. the control MG1820) were evaluated on bacteria attached to bare or PGM-coated polystyrene in PBS buffer and subjected to a stepwise increase in wall shear stress (0-80 Pa), under well-controlled hydrodynamics. First, we focused on the rinsing step with PBS buffer at low wall shear stress (0.03 Pa), achieved after the 3-h adhesion phase under static conditions. Table 1 displays the ratios A_0/A_i (with A_i and A_0 the surface coverage by the cells before and after the rinsing step, respectively) for IBB477 and MG1820 attached to bare (PS) and PGM-coated polystyrene (PS+PGM). We should note that, for PS+PGM, whatever the strain, the initial surface coverage (A_i) was lower than that obtained with PS (for instance, $2.4 \pm 0.9 \%$ and $1.1 \pm 0.8 \%$

for MG1820 on PS and PS+PGM, respectively). Furthermore, the effect of rinsing with PBS buffer was more pronounced for PGM-coated polystyrene (for instance, A_0/A_i ratio of $95.1 \pm 4 \%$ and $67.9 \pm 18.6 \%$ for MG1820 on PS and PS+PGM, respectively). This is a first indication of the anti-adhesive effect of adsorbed PGM towards MG1820 and, to a lesser extent, IBB477 ($67.9 \pm 18.6 \%$ and $89.5 \pm 10.3 \%$ on PS+PGM for MG1820 and IBB477, respectively).

Subsequent detachment profiles of IBB477 and MG1820 are presented in Figures 3 and 4, for PS and PS+PGM respectively. Adhesion of *L. lactis* to PS, which was driven by non-specific interactions (hydrophobic, electrostatic and van der Waals forces [14, 39]), was demonstrated to be strongly strain-dependent (Figure 3). For MG1820, increasing the wall shear stress progressively decreased the fraction of attached bacteria and a maximal 80 % detachment was achieved. In contrast, for IBB477, the fraction of detached bacteria was significantly lower and, at the end of the experiment (wall shear stress of 80 Pa), nearly 70% of the initial bacterial population remained attached to bare polystyrene. After PGM coating, adhesion level was significantly lower for both strains (Figure 4). This is consistent with anti-adhesive properties of mucin-based coatings [40], due to the conjunction of electrostatic, hydrophilic and steric repulsions, which are induced by PGM structural and interfacial complexity. However, we should note that, in the conditions under study (PBS buffer as suspending medium), electrostatic interactions were strongly inhibited by the high ionic strength. For the control MG1820, adhesion to PS+PGM was markedly reduced, especially for low τ_w values. For instance, at a wall shear stress of about 2 Pa, 40% of the initial bacterial population had been detached. Adhesion of IBB477 to PS+PGM was significantly enhanced in comparison with MG1820: for a wall shear stress of 2 Pa, almost no cell detachment occurred and, at the end of the experiment (wall shear stress of 80 Pa), nearly 40% of the initial bacterial population remained attached to PGM coating (10% for the control).

On the basis of our previous works on yeast cells, latex microbeads and *Bacillus* spores [19, 24, 27], detachment data were interpreted by evaluating the wall shear stress $\tau_{w50\%}$ needed to remove 50 % of the bacteria initially attached to PS and PS+PGM. $\tau_{w50\%}$ values obtained for IBB477 and MG1820 on PS and PS+PGM are reported in Table 2. For MG1820 on PS, $\tau_{w50\%}$ reached 16.1 ± 8.4 Pa (not reached for IBB477). As expected, $\tau_{w50\%}$ values on PS+PGM were drastically reduced compared to bare polystyrene, for both strains (3.8 ± 3.2 Pa and 54.9 ± 19.3 Pa for MG1820 and IBB477, respectively). The higher adhesion of IBB477 to PGM

coating compared to MG1820 was confirmed (increase in $\tau_{w50\%}$ by one order of magnitude). These trends are consistent with results previously depicted at the single-cell (AFM, recently published results, see *part III - 1.3*) and multicellular (QCM-D, see *part III - 2.1*) levels. Indeed, in AFM force spectroscopy using lacto-probes, the anti-adhesive effect of PGM was demonstrated under static conditions for MG1820 (adhesion force to PS+PGM six times inferior to that measured with PS alone) [14]. Furthermore, a twofold higher interaction force between *L. lactis* and PGM coating was measured for IBB477 compared to MG1820 (0.22 ± 0.05 nN vs. 0.12 ± 0.06 nN). The percentage of specific adhesive events was also different (20 % and 5 % for IBB477 and the control, respectively) (recently published results, see *part III - 1.3*). However, we should note that such AFM experiments were performed in milliQ-grade water, thereby with more electrostatic repulsion between negatively charged bacteria (see *part III - 1.1* on the physico-chemical surface properties of MG1820 and IBB477 strains,) and PGM. This point will be further discussed. In the study presented in *part III - 2.1* using QCM-D in PBS buffer, combined with a direct counting of attached bacteria, the muco-adhesive properties of IBB477 were confirmed. For MG1820, no significant change in frequency and dissipation occurred, with only few cells attached to the PGM-coated quartz crystal. In contrast, for IBB477, a sharp increase in Δf was observed, together with a higher number of attached cells. The resulting cell layer exhibited more viscoelastic properties (*i.e.*, high $\Delta D/\Delta f$ ratio). However, the precise mechanisms involved in IBB477 muco-adhesion are still unknown (molecular determinants, type and number of bonds), even though the possible role of protein/sugar interactions was recently pointed out (recently published results, see *part III - 1.3*).

4.2. Quantification of the adhesion force between *L. lactis* and PGM coating: comparison between IBB477 and MG1820 strains

4.2.1. Cell wall nanomechanical properties of IBB477 and MG1820 strains

In order to explore the cell wall nanomechanical properties of both IBB477 and MG1820 strains, force-distance curves were recorded, converted into force-indentation curves and then analyzed using the Hertz theory [35, 41] to generate elasticity maps (Figures 5c and 5d) and histograms (Figures 5e and 5f). Most curves were well-described by the Hertz model, allowing the Young modulus values to be determined: 4.8 ± 2.6 MPa and 9.1 ± 4.2 MPa for MG1820 and IBB477, respectively. These values, which are of the same order of magnitude,

are higher than the Young modulus reported for *Lactobacillus rhamnosus* GG (0.300 ± 0.063 MPa), probably due to the presence of a “soft” expolysaccharide layer on the cell wall [42]. The stiffness of the lactococci surface is essentially due to the internal turgor pressure and the peptidoglycane network (high cross-linking density and limited conformational flexibility of the β 1-4 linkage between N-acetylglucosamine and N-acetylmuramic acid) [42]. *L. lactis* bacteria can thus be regarded as rigid for modeling the adhesion force (see section 2 above). Furthermore, the ℓ_0 parameter was deduced from the root mean square (RMS) roughness, which was obtained from high-resolution height images ($500 \times 500 \text{ nm}^2$) of the cell surface: ℓ_0 was equal to $10.6 \pm 2.7 \text{ nm}$ and $14.7 \pm 3.7 \text{ nm}$ for MG1820 and IBB477 strains, respectively. The PGM layer thickness ($d=3.4 \text{ nm}$) [14] was taken into account to determine the characteristic thickness ℓ (see Equation (1)).

4.2.2. Theoretical mechanism for bacteria detachment

The mechanism for bacteria detachment was elucidated, for spherical-shaped bacteria, which is consistent with the lactococci morphology. From a general point of view, as presented in the section 2 “theoretical framework for modeling the adhesion force”, a spherical particle attached to a plane wall under shear flow is submitted to hydrodynamic drag, torque and lift, which contribute to particle removal from the solid surface. The mechanism of detachment can be sliding, rolling or lifting, depending on the relative magnitude of the three aforementioned effects (see Figure 1). Under the experimental conditions tested, *L. lactis* bacteria, attached to PS (or PS+PGM) under laminar shear flow, cannot be detached by lifting since the lift force is always negligible compared to the drag force. It was theoretically demonstrated that rolling mechanism is all the more expected for detachment as the particle radius increases, when the contact between the particle and the support follows a dry friction law [43, 44]. Unfortunately, the characteristic radius which promotes the rolling mechanism cannot be here determined since it depends on unknown friction coefficients between the particle and the solid surface.

In the present work, the model applied to determine the adhesion force does not make any assumption about the mechanism of detachment: Equation (7) giving the net adhesion force is valid whatever the mechanism involved. However, this mechanism is related to the value of α at detachment: α tends toward $\pi/2$ when detachment implies pure rolling and toward 0 when

pure sliding is involved [25]. The mechanism for bacteria detachment can be elucidated by combining Equations (4) and (5):

$$\frac{\cos \alpha}{\sin \alpha} = 1.03 \sqrt{\frac{\ell}{r}} \quad (11)$$

As ℓ is small compared to r (see below), α is close to $\pi/2$ and bacteria detachment is therefore expected to be mainly controlled by rolling.

4.2.3. Adhesion force between *L. lactis* and PGM coating

Once the mechanism for bacteria detachment had been elucidated from a theoretical point of view, the $\tau_{W50\%}$ values, reported in Table 2 for *L. lactis* attached to PS+PGM, enabled to calculate the net adhesion force (see Equation (7)), using the bacteria radius r and the characteristic thickness ℓ . The radius r , deduced from image processing during shear stress flow chamber experiments, was identical for both strains and reached $0.48 \pm 0.04 \mu\text{m}$. The thickness (ℓ) was equal to $14.0 \pm 2.7 \text{ nm}$ and $18.1 \pm 7.7 \text{ nm}$ for MG1820 and IBB477, respectively. Under these conditions, the adhesion force between *L. lactis* and PGM coating was estimated to be $0.16 \pm 0.18 \text{ nN}$ and $2.06 \pm 1.46 \text{ nN}$ for MG1820 and IBB477, respectively.

It is noteworthy that the adhesion force level for the control MG1820 is very similar to the value of $0.12 \pm 0.06 \text{ nN}$ previously measured by AFM force spectroscopy [14]. However, as previously mentioned, contrary to the shear stress flow chamber experiments (using PBS buffer as suspending medium), AFM measurements were carried out in milliQ-grade water. The ionic strength of the medium could influence the indentation of the AFM tip once in contact with the cell wall but probably not the adhesion force when retracting the tip. We checked such assumption by measuring the adhesion force of MG1820 strain to PS+PGM in milliQ-grade water or PBS buffer. There was no significant change (data not shown), thus allowing the comparison between AFM and flow chamber-based adhesion force levels. Note that, apart the pioneer work of Xu *et al.* [45] on *Staphylococcus aureus*/fibronectin interactions, this study is, to the best of our knowledge, the first to integrate data derived from direct (AFM) and indirect (flow chamber) methods, probing adhesion at multi-scale (single-cell *vs.* entire population). Contrary to MG1820 strain, the predicted value of the adhesion force for IBB477 ($2.06 \pm 1.46 \text{ nN}$) was tenfold higher than that measured with AFM ($0.22 \pm$

0.05 nN) (recently published results, see *part III-1.3*). We should recall that adhesion of *L. lactis* to PGM is mediated by a complex interplay between non-specific and specific forces, depending on the strain under study [14]. For the control low-adhesive MG1820, few specific adhesive events (5 %) were reported. Indeed, extracellular proteins with domains predicted to be involved in adhesion to mucus have been described for LAB [9]. These mucus-binding domains (MUB), found exclusively in LAB, are variable in size (100-200 residues per domain) and number (1-15 for a given protein). Among different LAB species, MUB domain-containing proteins are most abundant in lactobacilli, which are the natural inhabitants of the gastrointestinal tract [9]. By contrast, in traditional “domesticated” *L. lactis* strains, the presence of MUB-domain-containing proteins is limited. For instance, *L. lactis* MG1363 (original strain of MG1820) exhibits one single protein (encoded by the gene *llmg_2465*) with only three MUB-domains and no peptide signal, in comparison with *Lactobacillus gasseri* ATCC MUB 33323 which contains thirteen proteins with a number of MUB domains ranging from four to ten [9]. These differences may partly explain the low adhesion of the control strain MG1820 to PGM.

Conversely, for IBB477, the percentage of specific adhesive events was drastically increased (20 %) (recently published results, see *part III-1.3*). This probably illustrates the diversity in muco-adhesive behavior among *L. lactis* strains, as previously described for surface properties (charge, hydrophobicity) [10] or genetic and genomic traits [11]. On this basis, data of both AFM and flow-chamber experimental/modeling sets were combined to get a deeper understanding of the physico-chemical and biological mechanisms involved in IBB477 adhesion to PGM. In fact, probing interactions with AFM enables single-bond interaction forces to be measured [46, 47]. Moreover, based on the previous results depicted by Mercier-Bonin *et al.* [27] on latex microbeads, it was postulated that the net adhesion force, predicted from shear-flow induced detachment experiments, is proportional to the number of bonds between the *L. lactis* cell wall and the PGM-coated surface, according to:

$$\|F_{ad}\| = 2\pi r \ell C f_b \quad (12)$$

where f_b is the elementary interaction force of one single bond and C is the bond density in the contact area, which is supposed to be uniform. Therefore, considering for IBB477 strain the elementary interaction force as probed by AFM (f_b) and the predicted adhesion force ($\|F_{ad}\|$), the number of bonds was estimated to be $172 \pm 213 \times 10^{12}$ bonds/m². Such bonds were probably involved in specific molecular recognition, based on interactions between

proteinaceous compounds of the cell wall and the O-glycan moiety of PGM (recently published results, see *part III-1.3*). We should note that the bond density C was of the same order of magnitude as the value reported by Lorthois *et al.* [25] for fibrin/fibrin-specific molecular interactions. In line with this first estimation of the density of bonds involved in the IBB477/PGM interactions, further work will be devoted to identifying the determinants of the cell wall responsible for muco-adhesion and molecular recognition (MUB-domain containing proteins, pili, non-proteinaceous structures...).

5. CONCLUSION

With potential features to be integrated as functional food, mucosal vaccine or therapeutic drug delivery, it is of crucial importance to get a better understanding of interaction mechanisms between *L. lactis* and intestinal mucus, by focusing on one of its key components: mucins. Owing to our previous works with AFM force spectroscopy and QCM-D, the model mucin PGM (“Pig Gastric Mucin”) was chosen as target. Shear-flow induced *L. lactis* detachment experiments from bare and PGM-coated polystyrene were performed under well-controlled laminar flow conditions, in a shear stress flow chamber, with a view of comparing the muco-adhesive properties of two different strains at the entire population level: the IBB477 strain, which was previously shown to exhibit *in vivo* persistence in the rat gastrointestinal tract and the control strain MG1820. The presence of PGM coating strongly reduced bacterial adhesion with respect to the bare substrate, which is in line with the protective function generally ascribed to the mucus layer. However, adhesion of IBB477 to PGM was significantly increased in comparison with MG1820 (*i.e.*, lower fraction of detached cells over the entire range of wall shear stress). Adhesion force between *L. lactis* and PGM coating was modeled. A value of 0.16 ± 0.18 nN and 2.06 ± 1.46 nN was obtained for MG1820 and IBB477, respectively. Such predicted force levels were then compared to AFM measurements, which is to the best of our knowledge the first attempt to integrate data derived from direct (AFM) and indirect (flow chamber) methods, probing adhesion at multi-scale (single-cell *vs.* entire population). Contrary to MG1820 strain, the modeled adhesion force for IBB477 was tenfold higher than that measured with AFM (0.22 ± 0.05 nN), probably in line with the effective contribution of specific adhesive events. Our estimation of the density of bonds involved should be now confirmed through the identification of cell wall structures responsible for muco-adhesion and specific molecular recognition.

Acknowledgements

This work was supported by INRA (CEPIA and MICA Departments) through the doctoral grant of D.T.L. Le (2008-2011). The authors wish to thank Jacek Bardowski and Magdalena Kowalczyk (Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland) for the gift of IBB477 strain and for fruitful and stimulating discussions.

REFERENCES

1. Atuma, C., *et al.*, *The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo*. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 2001. **280**(5): p. G922-G929.
2. Cone, R.A., *Barrier properties of mucus*. Adv. Drug Deliv. Rev., 2009. **61**(2): p. 75-85.
3. Neutra, M. and J. Forstner, *Gastrointestinal mucus: synthesis, secretion, and function*, in *Physiology of the gastrointestinal tract*, L. Johnson, Editor 1987, Raven Press: New York.
4. Johansson, M.E.V., J.M. Holmén Larsson, and G.C. Hansson, *The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2010. **108**(Suppl 1): p. 4659-4665.
5. Johansson, M.E.V., *et al.*, *The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2008. **105**(39): p. 15064-15069.
6. Bansil, R. and B.S. Turner, *Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications*. Curr. Opin. Colloid Interface Sci., 2006. **11**(2-3): p. 164-170.
7. McGuckin, M.A., *et al.*, *Mucin dynamics and enteric pathogens*. Nat. Rev. Micro., 2011. **9**(4): p. 265-278.
8. Finegold, S.M., V.L. Sutter, and G.E. Mathisen, *Human intestinal microflora in health and disease*, ed. D.J. Hentges 1983, New York: Academic Press.
9. Boekhorst, J., *et al.*, *Comparative analysis of proteins with a mucus-binding domain found exclusively in lactic acid bacteria*. Microbiology, 2006. **152**(1): p. 273-280.
10. Giaouris, E., M.-P. Chapot-Chartier, and R. Briandet, *Surface physicochemical analysis of natural Lactococcus lactis strains reveals the existence of hydrophobic and low charged strains with altered adhesive properties*. Inter. J. Food Microbiol., 2009. **131**(1): p. 2-9.
11. Passerini, D., *et al.*, *Genes but not genomes reveal bacterial domestication of Lactococcus lactis*. PLoS ONE, 2010. **5**(12): p. e15306.
12. Norton, P., R. Le Page, and J. Wells, *Progress in the development of Lactococcus lactis as a recombinant mucosal vaccine delivery system*. Folia Microbiol., 1995. **40**(3): p. 225-230.
13. Steidler, L. and P. Rottiers, *Therapeutic drug delivery by genetically modified Lactococcus lactis*. Ann. N. Y. Acad. Sci., 2006. **1072**(1): p. 176-186.
14. Dague, E., Le D. T. L., *et al.*, *Probing in vitro interactions between Lactococcus lactis and mucins using AFM*. Langmuir, 2010. **26**(13): p. 11010-11017.
15. Boguslawska, J., *et al.*, *Intra- and interspecies conjugal transfer of Tn916-like elements from Lactococcus lactis in vitro and in vivo*. Appl. Environ. Microbiol., 2009. **75**(19): p. 6352-6360.
16. Rutter, P. and R. Leech, *The deposition of Streptococcus sanguis NCTC 7868 from a flowing suspension*. J. Gen. Microbiol., 1980. **120**(2): p. 301-307.
17. Busscher, H.J., H.C. van Der Mei, and I.O. Ron J. Doyle, [37] *Use of flow chamber devices and image analysis methods to study microbial adhesion*, in *Methods in Enzymology* 1995, Academic Press. p. 455-477.
18. McClaine, J.W. and R.M. Ford, *Characterizing the adhesion of motile and nonmotile Escherichia coli to a glass surface using a parallel-plate flow chamber*. Biotech. Bioeng., 2002. **78**(2): p. 179-189.
19. Mercier-Bonin, M., *et al.*, *Orientation and detachment dynamics of Bacillus spores from stainless steel under controlled shear flow: Modelling of the adhesion force*. Inter. J. Food Microbiol., 2011. **146**(2): p. 182-191.

20. Meinders, J.M., H.C. van der Mei, and H.J. Busscher, *Physicochemical aspects of deposition of Streptococcus thermophilus B to hydrophobic and hydrophilic substrata in a parallel plate flow chamber*. J. Colloid Interface Sci., 1994. **164**(2): p. 355-363.
21. Busscher, H.J., et al., *Streptococcus mutans and Streptococcus intermedius adhesion to fibronectin films are oppositely influenced by ionic strength*. Langmuir, 2008. **24**(19): p. 10968-10973.
22. Katsikogianni, M. and Y. Missirlis, *Bacterial adhesion onto materials with specific surface chemistries under flow conditions*. J. Mater. Sci. Mater. Med., 2010. **21**(3): p. 963-968.
23. Mercier-Bonin, M., et al., *Study of bioadhesion on a flat plate with a yeast/glass model system*. J. Colloid Interface Sci., 2004. **271**(2): p. 342-350.
24. Guillemot, G., et al., *Shear-flow induced detachment of Saccharomyces cerevisiae from stainless steel: Influence of yeast and solid surface properties*. Colloid. Surface. B, 2006. **49**(2): p. 126-135.
25. Lorthois, S., P. Schmitz, and E. Anglés-Cano, *Experimental study of fibrin/fibrin-specific molecular interactions using a sphere/plane adhesion model*. J. Colloid Interface Sci., 2001. **241**(1): p. 52-62.
26. Guillemot, G., et al., *Evaluating the adhesion force between Saccharomyces cerevisiae yeast cells and polystyrene from shear-flow induced detachment experiments*. Chem. Eng. Res. Design, 2007. **85**(6): p. 800-807.
27. Mercier-Bonin, M., et al., *Evaluation of adhesion force between functionalized microbeads and protein-coated stainless steel using shear-flow-induced detachment*. J. Colloid Interface Sci., 2009. **338**(1): p. 73-81.
28. Hammer, D.A. and D.A. Lauffenburger, *A dynamical model for receptor-mediated cell adhesion to surfaces*. Biophysical journal, 1987. **52**(3): p. 475-487.
29. Cozens-Roberts, C., J.A. Quinn, and D.A. Lauffenberger, *Receptor-mediated adhesion phenomena. Model studies with the radical-flow detachment assay*. Biophys. J., 1990. **58**(1): p. 107-125.
30. Kuo, S.C. and D.A. Lauffenburger, *Relationship between receptor/ligand binding affinity and adhesion strength*. Biophys. J., 1993. **65**(5): p. 2191-2200.
31. O'Neill, M.E., *A sphere in contact with a plane wall in a slow linear shear flow*. Chem. Eng. Sci., 1968. **23**(11): p. 1293-1298.
32. Krishnan, G.P. and J.D.T. Leighton, *Inertial lift on a moving sphere in contact with a plane wall in a shear flow*. Phys. Fluid., 1995. **7**(11): p. 2538-2545.
33. Brooks, S.B. and A. Tozeren, *Flow past an array of cells that are adherent to the bottom plate of a flow channel*. Computer. Fluid., 1996. **25**(8): p. 741-757.
34. Dufrêne, Y.F., *Atomic force microscopy and chemical force microscopy of microbial cells*. Nat. Protocols, 2008. **3**(7): p. 1132-1138.
35. Hertz, V.H.H., *Ueber die Berührung fester elastischer Körper*. J. Reine Angew. Math., 1881. **92**: p. 156-171.
36. Francius, G.g., et al., *Stiffening of soft polyelectrolyte architectures by multilayer capping evidenced by viscoelastic analysis of AFM indentation measurements*. J. Phys. Chem. C, 2007. **111**(23): p. 8299-8306.
37. Schneider, A., et al., *Polyelectrolyte multilayers with a tunable Young's modulus: influence of film stiffness on cell adhesion*. Langmuir, 2005. **22**(3): p. 1193-1200.
38. Touhami, A., B. Nysten, and Y.F. Dufrêne, *Nanoscale mapping of the elasticity of microbial cells by atomic force microscopy*. Langmuir, 2003. **19**(11): p. 4539-4543.
39. Dague, E., et al., *Chemical force microscopy of single live cells*. Nano Lett., 2007. **7**(10): p. 3026-3030.

40. Shi, L., *et al.*, *Mucin coating on polymeric material surfaces to suppress bacterial adhesion*. *Colloid. Surface. B*, 2000. **17**(4): p. 229-239.
41. Ikai, A., *et al.*, *Nano-mechanical methods in biochemistry using atomic force microscopy*. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 2003. **4**(3): p. 181-193.
42. Francius, G., *et al.*, *Detection, localization, and conformational analysis of single polysaccharide molecules on live bacteria*. *ACS Nano*, 2008. **2**(9): p. 1921-1929.
43. Elzo, D., *et al.*, *Measurement of particle/membrane interactions by a hydrodynamic method*. *J. Membrane Sci.*, 1996. **109**(1): p. 43-53.
44. Cardot, J., N. Blond, and P. Schmitz, *Adhesion and removal of particles from surfaces under humidity controlled air stream*. *J. Adhesion*, 2001. **75**(3): p. 351-368.
45. Xu, C.-P., *et al.*, *Staphylococcus aureus-fibronectin interactions with and without fibronectin-binding proteins and their role in adhesion and desorption*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008. **74**(24): p. 7522-7528.
46. Kienberger, F., H. Gruber, and P. Hinterdorfer, *Dynamic force microscopy and spectroscopy*, in *Applied scanning probe methods II*, B. Bhushan and H. Fuchs, Editors. 2006, Springer Berlin Heidelberg. p. 143-164.
47. Lee, C.-K., *et al.*, *Atomic force microscopy: Determination of unbinding force, off rate and energy barrier for protein-ligand interaction*. *Micron*, 2007. **38**(5): p. 446-461.

Table 1. Effect of the rinsing step with PBS buffer ($\tau_w=0.03$ Pa) after the 3-h adhesion phase for *L. lactis* cells (IBB477 and MG1820 strains), attached to bare (PS) or PGM-coated (PS+PGM) polystyrene surfaces. The given results are the average value and standard deviation over three independent coupons and separately grown cultures.

Surface	PS		PS+PGM	
	MG1820	IBB477	MG1820	IBB477
Strain	MG1820	IBB477	MG1820	IBB477
A_i before PBS rinsing (%)	2.4 ± 0.9	3.0 ± 0.4	1.1 ± 0.8	2.1 ± 0.7
A_0 after PBS rinsing (%)	2.3 ± 0.9	2.9 ± 0.4	0.7 ± 0.5	1.9 ± 0.7
A_0/A_i (%)	95.1 ± 4	97.3 ± 1.5	67.9 ± 18.6	89.5 ± 10.3

Table 2. Values of $\tau_{w50\%}$ for *L. lactis* cells (MG1820 and IBB477 strains), attached to PS and PS+PGM. The given results are the average value and standard deviation over three independent coupons and separately grown cultures.

Surface	PS		PS+PGM	
	MG1820	IBB477	MG1820	IBB477
Strain	MG1820	IBB477	MG1820	IBB477
$\tau_{w50\%}$ (Pa)	16.1 ± 8.4	Not reached	3.8 ± 3.2	54.9 ± 19.3

FIGURE CAPTIONS

Figure 1. Schematic diagram of a *L. lactis* cell attached to the PGM-coated polystyrene surface and definition of hydrodynamic forces, torque and adhesion force exerted over the spherical-shaped cell.

D: drag; L: lift and Γ_0 : torque at sphere centre, F_{ad} : adhesion force

r and a are the cell and contact area radii respectively, ℓ is the characteristic thickness of the macromolecular meshwork binding the cell to the PGM-coated polystyrene surface (taking into account the thickness of the PGM layer) and α is the angle which defines the direction of deformation of the material constituting the sticking layer.

Note that the schematic is not to scale.

Figure 2. Schematic representation of the experimental set-up.

(A) overview of the set-up; 1: feed tank, 2: toothed rack, 3: constant head vessel, 4: gear pump, 5: bubble trap, 6: computer for image acquisition and processing, 7: optical microscope, 8: camera, 9: fluid outlet, 10: vessel for fluid recycling, 11: peristaltic pump, 12: shear stress flow chamber

(B) detailed view of the shear stress flow chamber before (a) and after (b) assembling.

Figure 3. Shear flow-induced detachment profiles of *L. lactis* bacteria attached to bare polystyrene (PS) in PBS buffer; (●) IBB477 strain; (□) MG1820 strain. The given results are the average value and standard deviation over three independent coupons and separately grown cultures.

Figure 4. Shear flow-induced detachment profiles of *L. lactis* bacteria attached to PGM-coated polystyrene (PS+PGM) in PBS buffer; (●) IBB477 strain; (□) MG1820 strain. The given results are the average value and standard deviation over three independent coupons and separately grown cultures.

Figure 5. Mapping cell surface nanomechanical properties for IBB477 (in red) and MG1820 (in blue) using AFM. Bacteria were trapped into a porous polymeric membrane for non-

invasive *in situ* imaging; (a, b) deflection images recorded in milliQ-grade water for MG1820 (a) and IBB477 (b); (c, d) high resolution elasticity maps, together with (e, f) elasticity histograms for MG1820 (c, e) and IBB477 (d, f). The value of the Young modulus (average and standard deviation), derived from theoretical fitting using the Hertz model, is indicated for each strain.

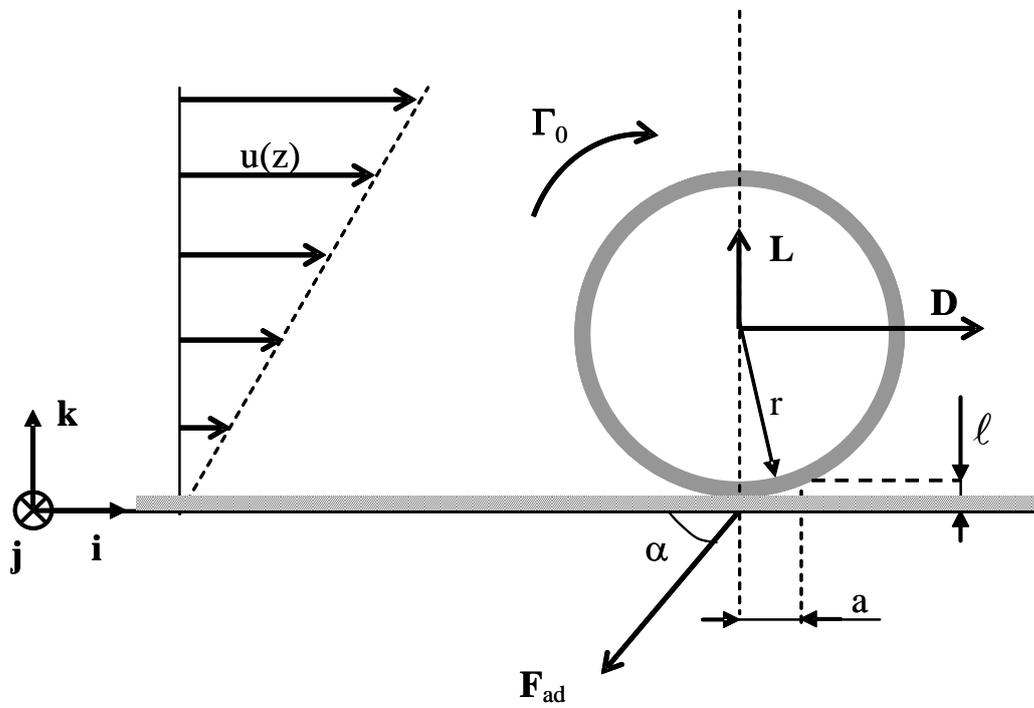


Figure 1

D. T. L. Le *et al.*

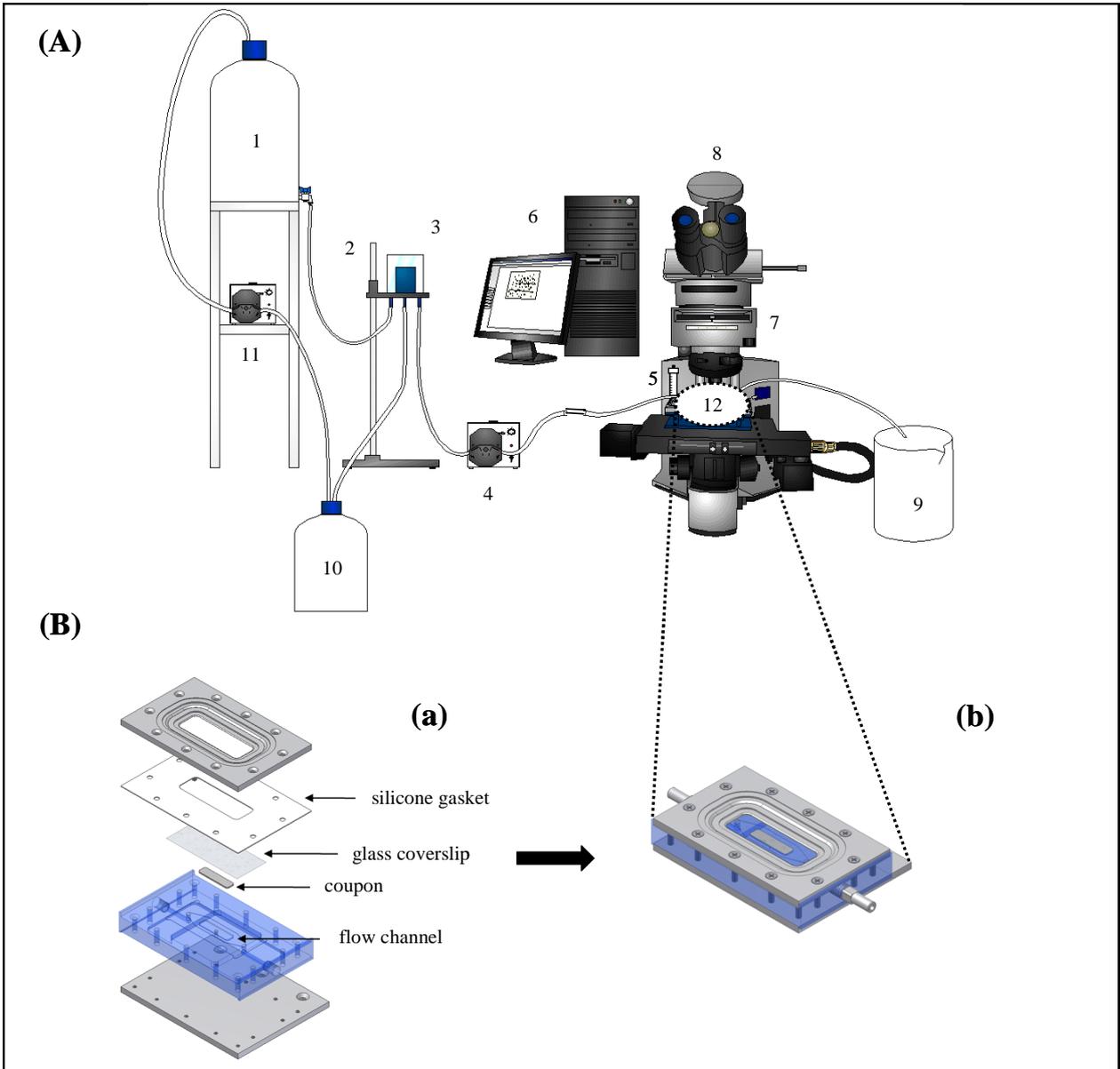


Figure 2

D. T. L. Le *et al.*

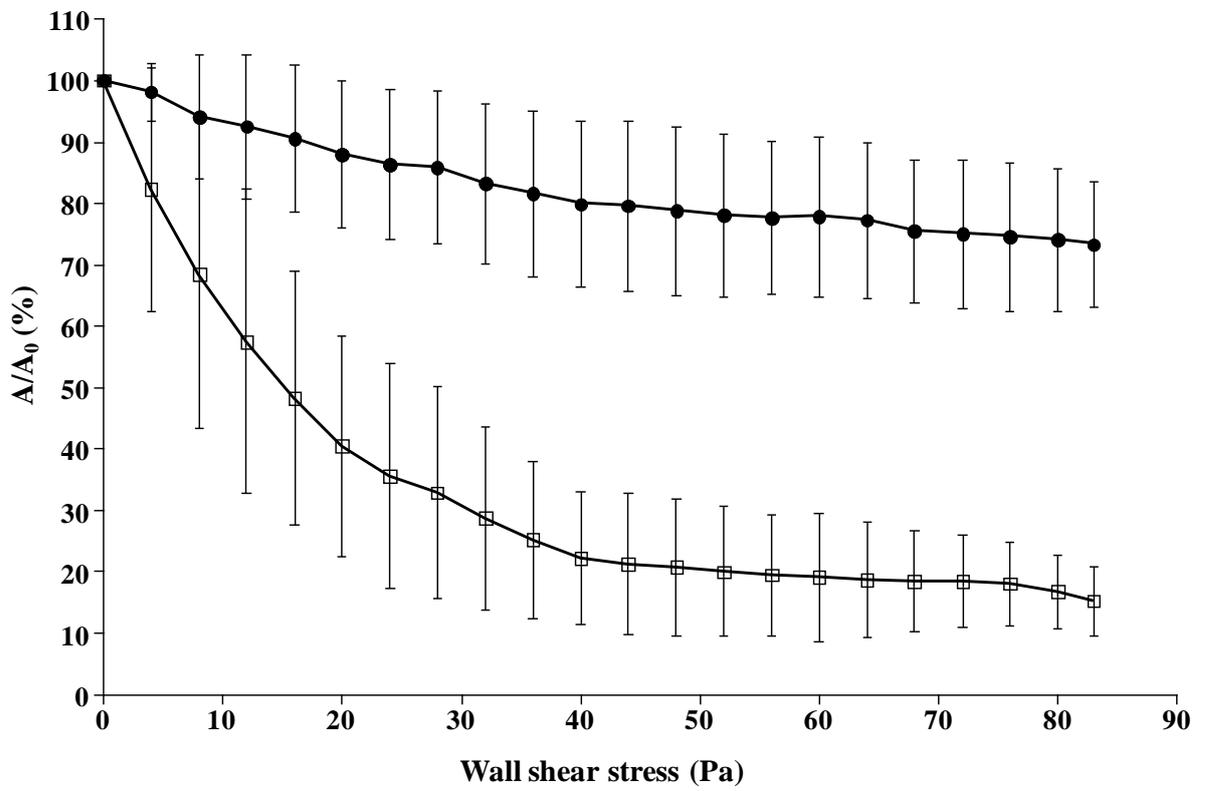


Figure 3

D. T. L. Le *et al.*

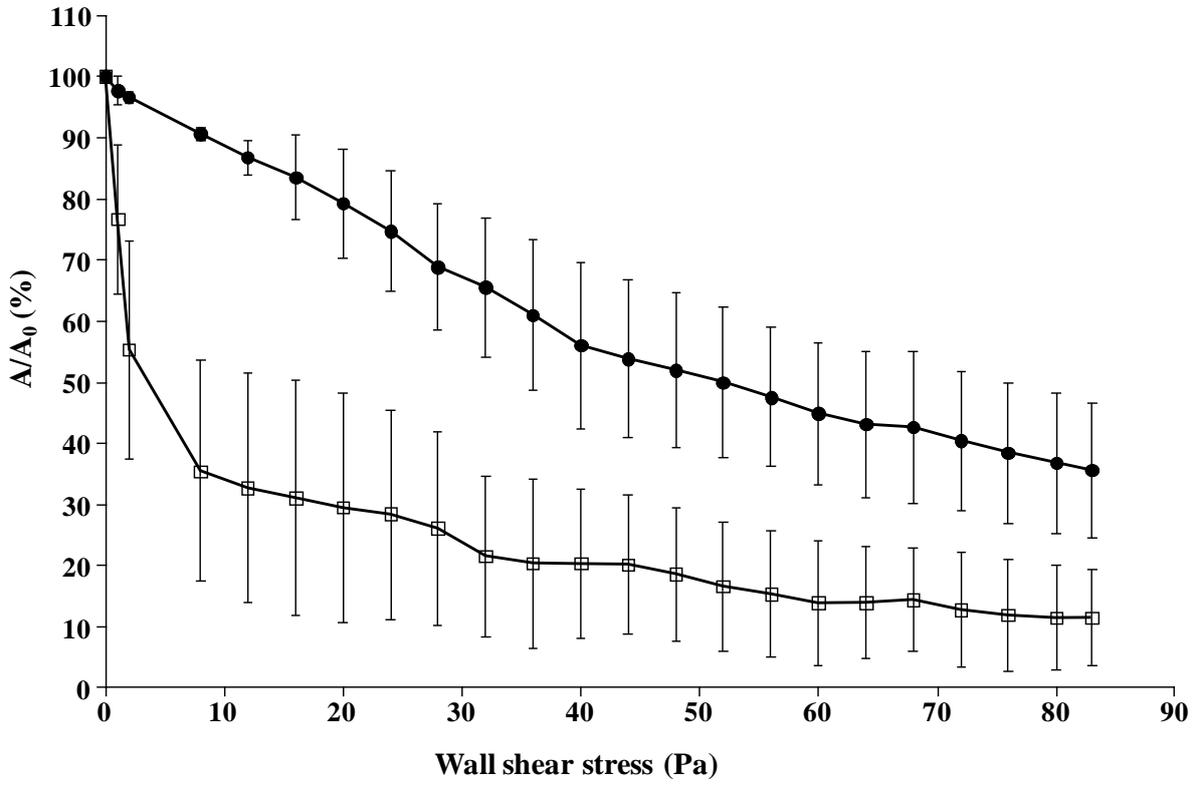


Figure 4

D. T. L. Le *et al.*

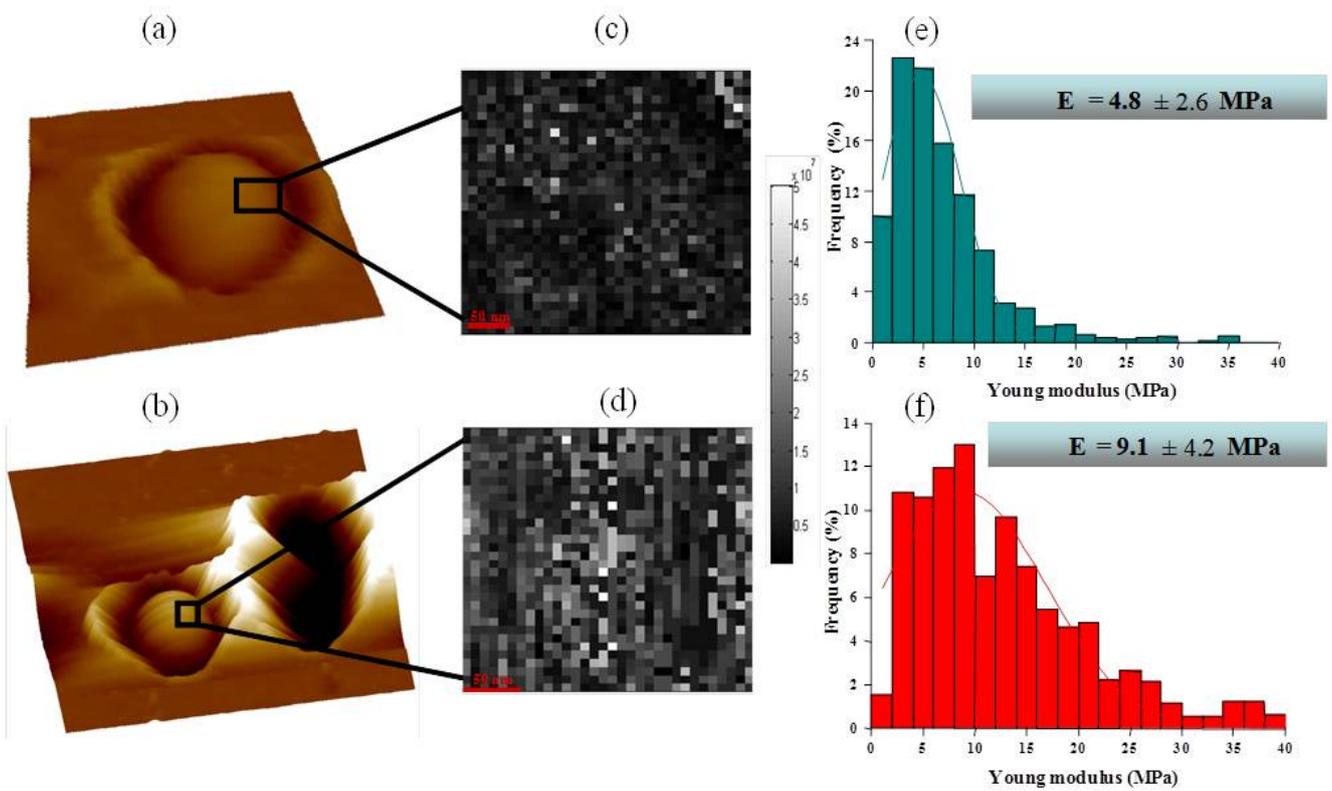


Figure 5

D. T. L. Le *et al.*

2.3. Evaluation du rôle des pili dans la muco-adhésion chez *L. lactis*

Objectif : cette étude vise à élucider la relation entre les pili chez *L. lactis* (souche de référence *L. lactis* ssp. *lactis* IL1403) et la muco-adhésion bactérienne, en couplant l'AFM et la chambre à écoulement cisailé (cellule unique vs. population bactérienne), en conditions statiques et dynamiques.

Matériels et méthodes : nous avons appliqué la méthode de quantification de la force d'adhésion à PGM par AFM (concept de la « lacto-pointe ») pour la souche recombinante *L. lactis* OpSrtC, exprimant des pili en surface, ainsi que pour la souche contrôle non piliée. En outre, des expériences de détachement en chambre à écoulement cisailé ont été réalisées pour ces deux souches, sur PS et PS+PGM en milieu salin (tampon PBS), selon la méthodologie mise au point au chapitre précédent sur IBB477 et MG1820. Une attention particulière a été accordée aux mécanismes de ré-orientation des bactéries sous cisaillement contrôlé.

Résultats : pour la souche contrôle non piliée en contact avec la surface PS+PGM, 64 % des courbes de force AFM ont été attribuées à des événements non adhésifs, ce qui peut être relié au pourcentage significatif de bactéries détachées, observé sous écoulement cisailé. En revanche, pour *L. lactis* OpSrtC, presque toutes les courbes de force (96 %) sont associées à des événements adhésifs tandis que 38 % des courbes de force correspondent à des interactions spécifiques biologiques. Ces résultats AFM sont cohérents avec ceux obtenus en chambre à écoulement, avec un pourcentage de bactéries détachées plus faible. La force d'adhésion pour *L. lactis* OpSrtC sur PS+PGM ($0,12 \pm 0,06$ nN) ainsi que la distance de rupture (jusqu'à 800 nm) sont en accord avec les valeurs trouvées dans la littérature pour d'autres types de souches piliées. Il faut noter une forte hétérogénéité au sein de la population en termes de morphologie (co-existence de quelques coques et de nombreuses cellules sous forme de chaînettes), avec des conséquences probables sur la force de traînée et l'aptitude au détachement. Pour la souche contrôle non piliée en contact avec PS, les bactéries ont tendance à se réorienter dans le sens de l'écoulement, sans doute pour minimiser les forces hydrodynamiques exercées par le fluide. En revanche, pour *L. lactis* OpSrtC, aucune réorientation significative n'a été observée dans la gamme expérimentale testée, les pili agissant probablement comme des sites d'ancrage fort. Nous avons enfin montré que, sur PS+PGM, la souche *L. lactis* piliée est plus sensible au détachement à faible contrainte de cisaillement et a tendance à s'ancrer plus solidement lors de l'augmentation de la contrainte.

**Unraveling at multi-scale the role of pili in
Lactococcus lactis muco-adhesion**

Doan Thanh Lam Le ^{1,2,3,4,5,6}, Virginie Oxaran ^{7,8}, Marie-Pierre Duviau ^{1,2,3}, Jean-Christophe Piard ^{7,8}, Pascal Loubière ^{1,2,3}, Etienne Dague ^{4,5,6}, Muriel Mercier-Bonin ^{1,2,3*}

¹ Université de Toulouse; INSA, UPS, INP; LISBP, 135 Avenue de Rangueil, F-31077 Toulouse, France

² INRA, UMR792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400 Toulouse, France

³ CNRS, UMR5504, F-31400 Toulouse, France

⁴ CNRS ; LAAS ; 7 avenue du colonel Roche, F-31077 Toulouse, France

⁵ Université de Toulouse ; UPS, INSA, INP, ISAE ; LAAS ; F-31077 Toulouse, France

⁶ Université de Toulouse ; UPS, INSA, INP, ISAE; UT1, UTM, LAAS, ITAV ; F-31077 Toulouse cedex 4, France

⁷ INRA, UMR1319 Micalis, F-78350 Jouy-en-Josas, France

⁸ AgroParisTech, UMR Micalis, F-78350 Jouy-en-Josas, France

Corresponding author:

Muriel Mercier-Bonin: Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, INSA, 135 avenue de Rangueil, 31077 Toulouse cedex 4, France.

Tel: +33 (0) 561 559 419

Fax: +33 (0) 561 559 400

E-mail: Muriel.Mercier-Bonin@insa-toulouse.fr

ABSTRACT

The present work was devoted to elucidate the role of pili in interactions between *Lactococcus lactis* (IL1403) and the model mucin PGM. Piliated *L. lactis* strains were previously shown to exhibit different phenotypes both in liquid media (aggregation) and on solid surfaces (biofilm), compared to their non-piliated counterparts. However, comprehensive understanding of pili functionalities in *L. lactis* muco-adhesion is still lacking. To this aim, data derived from direct (AFM) and indirect (shear stress flow chamber) methods were combined for quantifying adhesion at multi-scale (single-cell vs. entire population). Bare (PS) or PGM-coated polystyrene (PS+PGM) was probed with AFM force spectroscopy using dedicated lacto-probes, functionalized with the piliated *L. lactis* OpSrtC strain and the non-piliated control. In parallel, the shear stress flow chamber was implemented for monitoring the shear-flow induced detachment of both *L. lactis* strains under laminar flow conditions. For the control on PS+PGM, 64% of AFM force curves were assigned to non-adhesive events, which was corroborated to significant detachment fractions under shear flow. In contrast, for *L. lactis* OpSrtC, almost all force curves (96 %) corresponded to adhesive events and 38 % of force curves were assigned to specific biological interactions, in relation with lower cell detachment fractions in the shear stress flow chamber. The specificity of interactions was confirmed, as demonstrated by the dramatic reduction in adhesion frequency when AFM force curves were recorded in the presence of free PGM. The adhesion force (0.12 ± 0.06 nN) and the rupture distance (up to 800 nm) were consistent with values found in literature for non-LAB piliated strains. Special attention was paid to the role of variable flow conditions on pili-mediated detachment and re-orientation of *L. lactis* attached to PS or PS+PGM. First, a significant heterogeneity within the population in terms of morphology was observed, with the co-existence of few coccoid cells (round-shaped) and numerous chains of cells, with possible consequences on drag force and detachment ability. For the control attached to PS, bacteria tended to orientate in the flow direction, probably for minimizing hydrodynamic forces and torque exerted by fluid flow. In contrast, for *L. lactis* OpSrtC, no significant re-orientation under shear flow occurred in the experimental range tested, probably in line with the presence of pili as anchoring sites. On PS+PGM, the piliated *L. lactis* strain seemed to be more sensitive to detachment at low shear and tended to firmly anchor for increasing wall shear stress. This study provides the first evidence of pili involvement in *L. lactis* muco-adhesion under both static and dynamic conditions.

Keywords: *Lactococcus lactis*, pili, muco-adhesion, multi-scale, AFM, shear stress flow chamber

1. INTRODUCTION

In the gastrointestinal tract (GIT), the mucosal epithelium displays highly specialized functions, like digestion and absorption of ingested food, and elimination of undigested food, microorganisms and microbial-related products. In order to protect the mucosa, the host produces a thick layer of mucus covering the stomach, the small intestine and the large intestine [1, 2]. This protective barrier, which constitutes the first line of defense against physical and chemical injury [3], consists in two adjacent layers: a thin inner layer, which is sterile and physically difficult to dislodge, and a thicker outer one, which is not sterile and more diffuse [4, 5]. The major component of mucus is mucins that are responsible for its viscous, elastic gel-like and biological properties. The membrane-bound and secreted mucins are large glycoproteins exhibiting a protein backbone structure, linked to a complex array of hydrophilic oligosaccharide side-chains [6], representing potential ligands for microbial adhesins and/or energy source for commensal microorganisms in the outer mucus layer [7].

Physical interaction with the mucus layer, and especially mucins, is undoubtedly an important trait in understanding and improving the gut ecology. Compared with the present understanding of adhesive mechanisms of pathogenic bacteria, knowledge on the surface molecules mediating interactions with mucus is less advanced for beneficial microorganisms (probiotics, technological microbiota), like Lactic Acid Bacteria (LAB). Proteinaceous structures such as MUB-domain containing proteins have been recently depicted, using an *in silico* analysis [8]. Furthermore, the presence of pili and related muco-adhesion properties were reported in *Lactobacillus rhamnosus* GG [9], even though until recently non-pathogenic Gram positive bacteria were regarded as non-piliated bacteria.

Lactococcus lactis, considered as the model for LAB, is traditionally used as a starter in manufacturing cheese and other fermented dairy products. However, the biodiversity, observed among a large panel of natural *L. lactis* strains in terms of surface physico-chemical properties [10] and ecological niches [11], may now afford an important pool of new functionalities for food (probiotics [12]) and health-related applications (mucosal vaccine [13], therapeutic drug delivery [14], both potentially involving muco-adhesion. In our previous works ([15], recently published and submitted results, see *parts III - 1.3 and 1.4*⁵),

⁵ Ce renvoi en italiques fait référence aux différents chapitres de la partie Résultats du présent manuscrit.

the use of AFM force spectroscopy provided new insights into the interaction mechanisms between *L. lactis* and the model mucin PGM (“Pig Gastric Mucin”). Natural strains, belonging to different subspecies and isolated from various origins, were studied: *L. lactis* subsp. *cremoris* IBB477 strain (and its control strain MG1820), isolated from a dairy environment and which was shown to exhibit *in vivo* persistence in the rat gastrointestinal tract; *L. lactis* subsp. *lactis* TIL448 strain (vegetal origin) which exhibited high surface hydrophobicity [10] and specific adhesion to Caco-2 cells (M.-P. Chapot-Chartier, unpublished data). Interaction forces were directly quantified at nanoscale between an AFM tip functionalized with living *L. lactis* cells (“lacto-probe”) and PGM-coated polystyrene. Both non-specific (showing no extension before rupture) and specific forces (ligand/receptor bonding) were shown to be involved in *L. lactis* adhesion to PGM. Some typical force-distance curves obtained displayed one, two or three specific events, with each force peak due to a disruption of intra- and intermolecular interactions which represent a barrier against unfolding. When the externally applied force overcomes the strength of these molecular interactions in a given domain, all amino acids in that domain unfold spontaneously, together with an abrupt drop of the measured force to zero. High percentages of specific adhesive events were observed for natural strains (20 % and 60 % for IBB477 and TIL448, respectively), compared to their low-adhesive counterparts (about 5 %). Blocking assays with free PGM and O-glycans demonstrated that oligosaccharides played a major role in interactions between *L. lactis* and PGM, mainly by their neutral moiety (in the case of TIL448). The dual role played by “MUB-like” proteins and pili in *L. lactis* muco-adhesion was also demonstrated. Concerning the pili biogenesis and function in lactococci, Dieye *et al.* [16] recently provided genetic and biochemical evidence that *L. lactis* owns a housekeeping sortase A able to anchor at least 5 LPxTG proteins to its cell wall. This study also revealed the presence of another putative sortase of class C suggesting the presence of a pilus cluster in *L. lactis* genome. In a further work (Oxaran *et al.*, manuscript under preparation), the same authors characterized this pilus gene cluster and studied its function in pilus assembly in *L. lactis* (IL1403). Piliated *L. lactis* strains exhibited different phenotypes both in liquid media (aggregation) and on solid surfaces (biofilm), compared to their non-piliated counterparts. However, comprehensive understanding of pili functionalities in *L. lactis* adhesion is still lacking.

In this framework, this study was devoted to unravel the precise role of pili in interactions between *L. lactis* (IL1403) and the model mucin PGM at multi-scale. To this end, muco-

adhesion of the piliated *L. lactis* OpSrtC strain (vs. the non-piliated control) was probed at the single-cell scale with AFM force spectroscopy and at the entire population level, using a shear stress flow chamber under well-controlled hydrodynamics (laminar flow conditions), as previously depicted for IBB477 and MG1820 strains (see *part III - 2.2*). Such device, introduced several decades ago [17], has turned out to be powerful for studying microbial adhesion to surfaces [18, 19]. With the aid of optical microscopy, ultra-long-working-distance objectives, image analysis and controlled hydrodynamics, real-time monitoring of interactions between microorganisms and solid surfaces can be achieved *in situ* (*i.e.*, no air-liquid interface). Adhesion is accurately quantified taking into account not only physico-chemical and biological conditions but also heterogeneities within the microbial population [20]. In previous studies related to interactions between adhesins of gram-negative piliated bacteria and their specific receptors under well-controlled hydrodynamics, shear-enhanced adhesive characteristics were pointed out [21, 22]. Indeed, studying *Escherichia coli* attachment to monomannose-coated surfaces (*via* the type 1 fimbrial adhesive subunit, FimH), the authors showed that raising the wall shear stress (within the physiologically relevant range) increased accumulation of bacteria on monomannose surfaces by up to two orders of magnitude, while reducing the wall shear stress caused them to detach. It was concluded that FimH is force-activated *i.e.*, FimH mediates “catch-bonds” with mannose that are strengthened by tensile mechanical force. As a result, on monomannose-coated surfaces, bacteria displayed a complex “stick-and-roll” adhesion in which they tended to roll over the surface at low shear but increasingly halted to stick firmly as the shear was increased. Special attention was thus paid to the role of variable flow conditions on pili-mediated *L. lactis* adhesion to PGM. Re-orientation of bacteria under shear flow was also examined. In parallel, AFM force spectroscopy with dedicated lacto-probes was performed by focusing on specific interactions (percentage of specific adhesive events, elongation and rupture distance, blocking assays with free PGM). Data of both sets of experiments were then combined to establish differences between the muco-adhesive properties of piliated and non-piliated *L. lactis* strains towards the model mucin PGM.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Bacterial strains, plasmids, growth conditions and preparation of suspensions

Two wild-type background *L. lactis* IL1403 strains harboring plasmids were used (Table 1). The first strain is a *L. lactis* strain over-expressing its *srtC* operon (*yhgD-yhgE-srtC-yhhB*). For that purpose, the 4 *srtC* operon genes (*yhgD-yhgE-srtC-yhhB*) were cloned under control of the strong constitutive promoter, P23, in a high copy number vector, pIL253. This *srtC* over-expressing strain (thereafter named OpSrtC) was shown to display pili on its surface (Oxaran *et al.*, manuscript under preparation). The second strain corresponds to the negative control strain (thereafter called Control) which is not able to display pili. This strain harbors the empty vector, *i.e.* the high copy number vector, pIL253, containing the strong lactococcal promoter P23, but none of the 4 *srtC* operon genes.

Bacterial stock cultures were kept at -80 °C in M17 broth (Oxoid), containing 0.5 % (w/v) glucose and 20 % (v/v) glycerol. Bacteria were first subcultured at 30 °C in M17-glucose (0.5 % (w/v)) medium. This preculture was then used to inoculate a 500 mL-flask containing 100 mL of M17-glucose (0.5 % (w/v)) broth, which was incubated overnight at 30 °C until the early stationary phase was reached (optical density of 2.0 at a wavelength of 600 nm). Erythromycin (5 µg/mL) was used as required. Cells were harvested by centrifugation (4000 rpm, 5 min and room temperature) and washed twice with PBS buffer.

2.2. Preparation of the PGM-coated polystyrene surfaces

The mucin starting material was commercially available as a lyophilized powder (Sigma M1778). Partially purified type III mucin from porcine stomach, thereafter referred to as PGM (“Pig Gastric Mucin”), was dissolved in phosphate buffered saline (PBS) at pH=7.5 at a final concentration of 10 mg/mL. The solutions were prepared just before use.

Polystyrene was used as the substratum in the form of square (10.0 mm x 10.0 mm x 1.0 mm) or rectangular coupons (25.2 mm x 6.3 mm x 2.0 mm), for AFM and flow chamber experiments, respectively. Coupons were immersed in liquid detergent RBS 25 2 % (v/v) (Traitements Chimiques de Surfaces, Frelinghien, France) at 50°C for 15 minutes, rinsed in five successive baths of tap water at 50°C and five successive baths of tap water at room

temperature, rinsed with copious amounts of MilliQ-grade water (50°C and room temperature) and finally air-dried for 15 min under a vertical flow hood (Cytosafe 2000, Faster, Italy). Surfaces were either used immediately for the following steps or stored in a desiccator at room temperature until use.

PGM adsorption onto polystyrene was performed as previously described with slight modifications [15]. Briefly, polystyrene (PS) substrata, prepared according to the above procedure, were exposed overnight to a 10 mg/mL PGM solution in PBS pH=7.5 at 4 °C, under gentle agitation. After incubation, surfaces were copiously rinsed to remove loosely bound material using, in sequence, PBS buffer and MilliQ-grade water and finally air-dried under a vertical flow hood (Cytosafe 2000, Faster, Italy).

2.3. Lacto-probe design

OTR4 (Si₃N₄) probes, purchased from Veeco Instruments SAS (Dourdan, France), were used for the lacto-probe preparation, as described elsewhere [15]. Briefly, cantilevers and tips, first cleaned for 15 min with UV/O₃ treatment, were pre-coated with polyethylenimine (PEI) by immersion for 5 hours in a PEI solution (0.1 % (w/v) in MilliQ-grade water), rinsed with a copious amount of MilliQ-grade water and stored under light vacuum. The negatively charged *L. lactis* cells (Oxaran *et al.*, manuscript under preparation), suspended in MilliQ-grade water (OD_{600nm}=1), were attached to the positively charged PEI-coated probes by electrostatic attraction, through a 20-min contact time. The lacto-probes, finally rinsed with MilliQ-grade water, were ready for further experiments.

2.4. Force spectroscopy using AFM

AFM experiments were performed in PBS buffer and at room temperature, using the Catalyst system from Veeco Process Equipment Inc. (Santa Barbara, USA). Interactions between the lacto-probe and the PGM-coated polystyrene surface (PS+PGM) were assessed for the pilated strain (*L. lactis* OpSrtC) and the non-piliated one (control) by recording single force-distance curves and matrix of 32 x 32 force-distance curves on 5 x 5 μm² squares. Experiments were performed in triplicate with independent PGM-coated surfaces and lacto-probes. Blocking assays were carried out with free PGM (10 mg/mL in PBS buffer). The spring constants of the tips were measured for each probe and were in the range 0.02 - 0.03

N/m. Adhesion forces, deduced from the force-distance curves, were quantified using Research Nanoscope 8.31 software from Veeco Instruments SAS. In brief, the deflection data, recorded during the retraction of the tip from the PGM-coated surface, were converted to force after multiplication with the spring constant of each individual cantilever, whereas the real tip-substrate distance was obtained by subtracting the deflection from the piezo movement. The point of zero distance was assigned at the intersection of the experimental curve with the straight line fitting the tail of the curve. Bond-rupture distances were deduced from the force vs. distance curves as the point of zero distance, subtracted from the point at which a negative deflection returns to zero.

2.5. *L. lactis* bacteria detachment in the shear stress flow chamber

The effect of PGM coating on pili-mediated *L. lactis* adhesion was evaluated *in vitro* by performing shear flow-induced detachment experiments on sessile bacteria, in a shear stress flow chamber, under laminar flow conditions.

Bare or PGM-coated polystyrene coupons (PS and PS+PGM, respectively) were subjected to shear flow-induced detachment experiments for *L. lactis* OpSrtC and control strains, at room temperature, according to the procedure previously described for IBB477 and MG1820 (see *part III - 2.2*). Removal of attached bacteria was analyzed in a rectangular flow channel (12-mm width and 200- μm thickness). The flow chamber also comprised a specially-designed diverging upstream channel, in order to ensure a uniform flow at the inlet of the rectangular part [20]. In the observation area where bacteria are deposited, *i.e.* downstream the entrance region and in the central region of the flow channel, wall shear stress τ_w is given by:

$$\tau_w = \frac{3\mu Q}{4h^2l} \quad (1)$$

where μ is the fluid dynamic viscosity (Pa.s), Q ($\text{m}^3.\text{s}^{-1}$) is the flow rate, l and h are respectively the channel half-width and half-thickness (m).

The Reynolds number Re is given by the following equation:

$$Re = \frac{Q}{2lv} \quad (2)$$

where v is the fluid kinematic viscosity ($\text{m}^2.\text{s}^{-1}$).

Prior to each detachment experiment, the flow chamber and all tubes were filled with PBS buffer, while care was taken to remove air bubbles from the system. 700 μL of the cell suspension ($\text{OD}_{580\text{nm}}$ of 0.2) were slowly injected into the flow chamber and allowed to attach to the solid surface (PS or PS+PGM) under static conditions for 3 hours. Images, collected using the reflection mode of an optical microscope (Nikon Eclipse LV100) equipped with a 40x ultra-long working distance objective, were recorded by a camera (digital STGHT DS-2MBW, Nikon) and the NIS-Elements F3.0 video acquisition software. The field of view was 144 μm by 108 μm with a resolution of 0.09 μm per pixel. Owing to our previous results on velocity field in the flow chamber and uniform flow conditions [20], special care was taken to properly choose the observation area. Images were analyzed for estimating the percentage of the surface occupied by attached cells with the free software Macbiophotonics ImageJ (www.macbiophotonics.ca) and the Matlab software (Mathworks Inc., USA).

After the 3-h adhesion step (initial surface coverage denoted A_i), rinsing with PBS buffer was achieved at a low flow rate of $0.002 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$ (corresponding to a wall shear stress of about 0.03 Pa) in order to eliminate loosely adhered bacteria. The percentage of remaining attached cells was thereafter referred as to A_0 . We should note that the A_0 value was in the range 1 % - 3 % of the total surface area, so that any interactions between neighboring bacteria were considered as minimal. Laminar flow of PBS buffer was then imposed, with a stepwise increase in the flow rate (maximal value of $6.7 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$), with 3-min step duration. Flow rates ranging from 0.002 to $0.3 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$ to were generated by gravity, controlling through a toothed rack the height of a constant head vessel located upstream of the chamber. Higher flow rates were obtained using a gear pump (Ismatec, Fisher Bioblock Scientific). The maximal Reynolds number was equal to 560 (laminar conditions). The wall shear stress τ_w was in the range 0–80 Pa.

At the end of each step, the surface coverage by attached bacteria (A) was estimated. The detachment profile, representing the ratio A/A_0 as a function of the wall shear stress τ_w , was plotted. Each condition (PS vs. PS+PGM) was performed in triplicate for *L. lactis* OpSrtC and control strains with independent coupons and separately grown cultures.

3. RESULTS AND DISCUSSION

AFM force spectroscopy was performed according to the procedure described elsewhere ([15], recently published and submitted results, see *parts III - 1.3 and 1.4*). To this end, bare (PS) or PGM-coated polystyrene (PS+PGM) was probed with the biologically functionalized probe, using *L. lactis* OpSrtC and the non-piliated control. The shear stress flow chamber was then implemented for monitoring the shear-flow induced detachment of both *L. lactis* strains under laminar flow conditions. Special attention was paid to the role of variable flow conditions on adhesion and re-orientation of bacteria. Data derived from direct (AFM) and indirect (flow chamber) methods were then combined to establish for the first time the role of pili in *L. lactis* muco-adhesion.

3.1. Probing by AFM adhesion of piliated and non-piliated *L. lactis* strains to PS and PS+PGM surfaces

Interactions between piliated and non-piliated *L. lactis* strains were first probed on bare polystyrene (PS) in PBS buffer. Adhesion forces of 0.43 ± 0.03 nN and 0.29 ± 0.04 nN were achieved respectively (Figure 1). After PGM coating, the piliated strain displayed an adhesion force of 0.12 ± 0.06 nN, while no value could reasonably be given for the low-adhesive control (Figures 2a and 2b). This force level is consistent with results depicted for piliated-*Pseudomonas aeruginosa* cell probe in contact with mica [23]. In this study, the authors described a two-step mechanism: (i) the type-IV pili were unraveled over a distance of roughly 1 μm (depending on the pili length), (ii) rupture of the pili-surface complex partly occurred, corresponding to a mean peak force of 0.095 nN. Elsewhere, the retraction forces for type-IV pili of *Neisseria gonorrhoeae*, determined by optical tweezer [24], reached 0.11 ± 0.03 nN. Furthermore, as previously depicted [15], adhesion of piliated and non-piliated *L. lactis* strains to PGM was characterized by the combination of three representative curve shapes: (1) no adhesive event, detected when retracting the tip from PGM-coated polystyrene, (2) non-specific adhesive events (showing no extension before rupture) and (3) specific one, two or three adhesive events, occurring at several nanometers after the contact point. The particular shape of group-3 retraction force curves, involving ligand/receptor bonding such as protein/sugar complexes (recently published results, see *part III - 1.3*), could be due to multiple contact sites of bacteria and/or stretching of the PGM molecules. The significance of rupture length will be further discussed. A thorough analysis of such force-distance curves for

each strain was then performed by focusing on the respective role of non-adhesive events, non-specific and specific adhesive events. For the control, 64 % of force curves corresponded to non-adhesive events while 31 % of force curves were characteristic of non-specific physico-chemical interactions (including hydrophobic, electrostatic and van der Waals forces). Only 5 % of force curves were assigned to specific adhesive events. Such force repartition was consistent with previously published data [15] for the low-adhesive control *L. lactis* MG1820. In contrast, for *L. lactis* OpSrtC, almost all force curves (96 %) corresponded to adhesive events and 38 % of force curves were assigned to specific biological interactions.

In order to get a more thorough understanding of the specificity of the interaction events observed for *L. lactis* OpSrtC, additional blocking experiments with free PGM were carried out. To this end, the lacto-probe was incubated in PGM, before putting it in contact with the PGM-based coating. As sketched in Figure 2, it was speculated that potential binding sites on the bacteria surface were saturated, with an efficiency correlated to their affinity towards PGM, and were thus not able to react anymore with the PGM layer. For *L. lactis* OpSrtC and the control, pre-incubation of the lacto-probe with PGM dramatically reduced the number of curves showing adhesive events as well as the measured binding forces, indicating that the adhesion forces measured using the lacto-probe were specific to the pili-mediated adhesion of *L. lactis* to PGM. Indeed, the percentage of non-adhesive events drastically increased, from 4 % to 69 % (Figure 2b') and from 64 % to 72 % (Figure 2a'), for *L. lactis* OpSrtC and the control, respectively.

Another important AFM parameter to deal with is the bond-rupture distance, which is defined as the distance from the start of retraction to the point of final rupture. This essentially corresponds to the distance between the AFM tip and the substrate when the ligand-receptor complex is fully extended. For *L. lactis* OpSrtC, we observed rupture events at short distances (100-200 nm) and/or long distances (up to 600-800 nm) (Figure 3). The existence of such long rupture distances is consistent with the elongated architecture of pili [25, 26]. We should note that, in a previous AFM study probing interactions between pili-displaying bacteria and mica [23], the authors observed long rupture distances (up to 1 μm). When the mutant without pili was tested, rupture lengths were drastically reduced (10 to 100 nm), which is in line with our own results for the control (data not shown). Such behaviour was also depicted for the natural strain TIL448 (see *part III - 1.4*).

3.2. Shear-flow induced detachment of *L. lactis* from bare and PGM-coated polystyrene: comparison between piliated and non-piliated strains

The respective roles of pili and PGM coating on *L. lactis* adhesion were evaluated on bacteria attached to bare or PGM-coated polystyrene in PBS buffer and subjected to a stepwise increase in wall shear stress (0-80 Pa), under well-controlled hydrodynamics (laminar flow conditions).

Detachment profiles of piliated and non-piliated strains are presented in Figures 4 and 5, for PS and PS+PGM respectively. Detachment data were also interpreted by evaluating the wall shear stress $\tau_{W50\%}$ needed to remove 50 % of the bacteria initially attached to PS and PS+PGM (Table 2). Note that the role of rinsing step with PBS buffer at low wall shear stress (0.03 Pa), achieved after the 3-h adhesion phase under static conditions, was evaluated and will be further discussed. Adhesion of *L. lactis* to PS, which was driven by non-specific interactions (hydrophobic, electrostatic and van der Waals forces), was demonstrated to be strongly strain-dependent (Figure 3). For the control, increasing the wall shear stress progressively decreased the fraction of attached bacteria and a maximal 80 % detachment was achieved (applied wall shear stress of 65 Pa). In contrast, for *L. lactis* OpSrtC, the fraction of detached bacteria was significantly lower and, at the end of the experiment, nearly 80% of the initial bacterial population remained attached to bare polystyrene. For the control, $\tau_{W50\%}$ reached 28.3 ± 5.1 Pa (not reached for *L. lactis* OpSrtC). All these trends are consistent with above AFM results showing a higher adhesion for the piliated strain (0.43 ± 0.03 nN and 0.29 ± 0.04 nN for *L. lactis* OpSrtC and the control, respectively).

Another point to deal with was the role of pili in the bacteria mobility under shear flow. Figures 6(a-d) and 6(a'-d') display a series of snapshots of *L. lactis* OpSrtC and the control attached to PS and subjected to increasing wall shear stress (ranging from 0.04 to 50 Pa) in the shear stress flow chamber. The motion of piliated and non-piliated bacteria was tracked during the course of the detachment experiment. First, a significant heterogeneity within the population in terms of morphology was observed, with the co-existence of few coccoid cells (round-shaped) and numerous chains of cells, which was not previously observed for IBB477 and MG1820 strains (mainly isolated cells, data not shown). For the control, detachment occurred and bacteria tended to orientate in the flow direction, probably for minimizing hydrodynamic forces and torque exerted by fluid flow. In contrast, for *L. lactis* OpSrtC,

neither significant detachment nor re-orientation under shear flow occurred in the experimental range tested. The presence of pili as anchoring sites could be involved in such behaviour.

After PGM coating, adhesion level was significantly lower for both strains (Figure 5), as previously described for IBB477 and MG1820 strains in the shear stress flow chamber (see *part III - 2.2*). As a consequence, $\tau_{W50\%}$ values on PS+PGM were drastically reduced compared to PS (3.7 ± 1.9 Pa and 12.4 ± 1.9 Pa for the control and *L. lactis* OpSrtC, respectively). We should note that the $\tau_{W50\%}$ values on PS+PGM were similar for low-adhesive controls, whatever the subspecies involved (*lactis* vs. *cremoris*) (see *part III - 2.2*). The higher adhesion of *L. lactis* OpSrtC to PGM coating compared to the non-piliated control, observed above with AFM measurements, was confirmed (fourfold increase in $\tau_{W50\%}$). For wall shear stresses above 50 Pa, differences between detachment profiles tended to collapse. However, we should note that such values are far beyond the physiologically relevant range.

We finally focused on the rinsing step with PBS buffer at low wall shear stress (0.03 Pa), achieved after the 3-h adhesion phase under static conditions. Table 3 displays the ratios A_0/A_i (with A_i and A_0 the surface coverage by the cells before and after the rinsing step, respectively) for *L. lactis* OpSrtC and the control, attached to bare (PS) and PGM-coated polystyrene (PS+PGM). For PS, consistent with our previous observations on the lower detachment fraction for the piliated strain from bare polystyrene (Figure 4), the A_0/A_i ratio was higher (98.3 ± 1.5 % and 82.1 ± 1.3 % for *L. lactis* OpSrtC and the control, respectively). As expected, due to PGM anti-adhesive effect, rinsing with PBS buffer was more efficient for PGM-coated polystyrene. However, despite higher muco-adhesive properties of *L. lactis* OpSrtC compared to the non-piliated control, as observed over a wide range of applied wall shear stress (Figure 5), the A_0/A_i ratio was surprisingly lower (37.1 ± 6.5 % and 67.2 ± 18.5 % for *L. lactis* OpSrtC and the control, respectively). In other words, the piliated *L. lactis* strain seems to be more sensitive to detachment at low shear and tends to firmly anchor for increasing wall shear stress. In literature, some authors previously depicted a related phenomenon in *E. coli*, called “shear-enhanced adhesive characteristics” [21, 22, 27]. They showed that the interaction between the type-1 fimbrial adhesive subunit FimH and its ligand mannose was mediated by hydrodynamic conditions. Indeed, raising the wall shear stress (within the physiologically relevant range) increased accumulation of bacteria on monomannose surfaces by up to two orders of magnitude, while reducing the wall shear stress

caused them to detach. It was concluded that FimH is force-activated *i.e.*, FimH forms “catch-bonds” with mannose that are strengthened by tensile mechanical force, resulting in a switch from weak short-lived to strong short-lived binding. In fact, FimH is a two-domain protein consisting of the mannose-binding lectin domain and the fimbria-incorporating pilin domain. On the top of the lectin domain, distal from the pilin domain, is the ligand-binding pocket that accommodates a 1M³ residue [28]. Using steered molecular dynamics simulations and site-directed mutagenesis of FimH, Thomas *et al.* [27] showed that affinity to monomannose was probably enhanced by the tensile force-induced extension of a 3-amino acid linker chain between the two domains of FimH, distal from the mannose-binding site. In our case, the role of pili structure and function on the possible “shear-enhanced muco-adhesive properties” of *L. lactis* should be more deeply investigated in further work.

In conclusion, the combination of AFM and flow chamber experiments for probing interaction(s) enabled the role of pili in *L. lactis* muco-adhesion (IL1403) to be unraveled for the first time at multi-scale (single cell *vs.* entire bacterial population). The effects of pili structure and function on possible “shear-enhanced muco-adhesive properties” for *L. lactis* should be now more deeply investigated for further applications as functional food, mucosal vaccine or therapeutic drug delivery.

Acknowledgements

This work was supported by INRA (CEPIA and MICA Departments) through the doctoral grant of D.T.L. Le (2008-2011).

REFERENCES

1. Atuma, C., *et al.*, *The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo*. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 2001. **280**(5): p. G922-G929.
2. Cone, R.A., *Barrier properties of mucus*. Adv. Drug Deliv. Rev., 2009. **61**(2): p. 75-85.
3. Neutra, M. and J. Forstner, *Gastrointestinal mucus: synthesis, secretion, and function*, in *Physiology of the gastrointestinal tract*, L. Johnson, Editor 1987, Raven Press: New York.
4. Johansson, M.E.V., J.M. Holmén Larsson, and G.C. Hansson, *The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2010. **108**(Suppl 1): p. 4659-4665.
5. Johansson, M.E.V., *et al.*, *The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2008. **105**(39): p. 15064-15069.
6. Bansil, R. and B.S. Turner, *Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications*. Curr. Opin. Colloid Interface Sci., 2006. **11**(2-3): p. 164-170.
7. McGuckin, M.A., *et al.*, *Mucin dynamics and enteric pathogens*. Nat. Rev. Micro., 2011. **9**(4): p. 265-278.
8. Finegold, S.M., V.L. Sutter, and G.E. Mathisen, *Human intestinal microflora in health and disease*, ed. D.J. Hentges 1983, New York: Academic Press.
9. Boekhorst, J., *et al.*, *Comparative analysis of proteins with a mucus-binding domain found exclusively in lactic acid bacteria*. Microbiology, 2006. **152**(1): p. 273-280.
10. Giaouris, E., M.-P. Chapot-Chartier, and R. Briandet, *Surface physicochemical analysis of natural Lactococcus lactis strains reveals the existence of hydrophobic and low charged strains with altered adhesive properties*. Inter. J. Food Microbiol., 2009. **131**(1): p. 2-9.
11. Passerini, D., *et al.*, *Genes but not genomes reveal bacterial domestication of Lactococcus lactis*. PLoS ONE, 2010. **5**(12): p. e15306.
12. Kimoto, H., *et al.*, *Lactococci as probiotic strains: adhesion to human enterocyte-like Caco-2 cells and tolerance to low pH and bile*. Lett. Appl. Microbiol., 1999. **29**(5): p. 313-316.
13. Wells, J.M., P.M. Norton, and R.W.F. Le Page, *Progress in the development of mucosal vaccines based on Lactococcus lactis*. Int. Dairy J., 1995. **5**(8): p. 1071-1079.
14. Steidler, L. and P. Rottiers, *Therapeutic drug delivery by genetically modified Lactococcus lactis*. Ann. N. Y. Acad. Sci., 2006. **1072**(1): p. 176-186.
15. Dague, E., Le, D.T.L., *et al.*, *Probing in vitro interactions between Lactococcus lactis and mucins using AFM*. Langmuir, 2010. **26**(13): p. 11010-11017.
16. Dieye, Y., *et al.*, *Functionality of sortase A in Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol., 2010. **76**(21): p. 7332-7337.
17. Rutter, P. and R. Leech, *The deposition of Streptococcus sanguis NCTC 7868 from a flowing suspension*. J Gen Microbiol, 1980. **120**(2): p. 301-307.
18. Busscher, H.J. and H.C. van Der Mei, *Use of flow chamber devices and image analysis methods to study microbial adhesion*, in *Methods in Enzymology*, J.D. Ron and O. Itzhak, Editors. 1995, Academic Press. p. 455-477.
19. McClaine, J.W. and R.M. Ford, *Characterizing the adhesion of motile and nonmotile Escherichia coli to a glass surface using a parallel-plate flow chamber*. Biotech. Bioeng., 2002. **78**(2): p. 179-189.

20. Mercier-Bonin, M., *et al.*, *Orientation and detachment dynamics of Bacillus spores from stainless steel under controlled shear flow: Modelling of the adhesion force*. *Inter. J. Food Microbiol.*, 2011. **146**(2): p. 182-191.
21. Nilsson, L.M., *et al.*, *Catch bond-mediated adhesion without a shear threshold*. *J. Bio. Chem.*, 2006. **281**(24): p. 16656-16663.
22. Thomas, W.E., *et al.*, *Shear-dependent 'stick-and-roll' adhesion of type 1 fimbriated Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 2004. **53**(5): p. 1545-1557.
23. Touhami, A., *et al.*, *Nanoscale characterization and determination of adhesion forces of Pseudomonas aeruginosa pili by using atomic force microscopy*. *J. Bacteriol.*, 2006. **188**(2): p. 370-377.
24. Maier, B., *et al.*, *Single pilus motor forces exceed 100 pN*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2002. **99**(25): p. 16012-16017.
25. Mandlik, A., *et al.*, *Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development*. *Trends Microbiol.*, 2008. **16**(1): p. 33-40.
26. Proft, T. and E. Baker, *Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria — structure, assembly and their role in disease*. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2009. **66**(4): p. 613-635.
27. Thomas, W.E., *et al.*, *Bacterial adhesion to target cells enhanced by shear force*. *Cell*, 2002. **109**(7): p. 913-923.
28. Hung, C.-S., *et al.*, *Structural basis of tropism of Escherichia coli to the bladder during urinary tract infection*. *Mol. Microbiol.*, 2002. **44**(4): p. 903-915.

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study.

Strain or plasmid	Relevant characteristics*
Strain	
<i>L. lactis</i> IL1403	
VE17179	Wild-type, pVE5619, Em ^r (designated as Control)
VE17173	Wild-type, pVE5618, Em ^r
Plasmid	
pVE5618	pIL253:: <i>P23-yhgD-yhgE-srtC-yhhB</i> , Em ^r
pVE5619	pIL253:: <i>P23</i> , Em ^r

* Em^r: erythromycin resistant

Table 2. Values of $\tau_{W50\%}$ for *L. lactis* OpSrtC and the non-piliated control, attached to PS and PS+PGM. The given results are the average value and standard deviation over three independent coupons and separately grown cultures.

Surface	PS		PS+PGM	
		<i>L. lactis</i>		<i>L. lactis</i>
Strain	Control	OpSrtC	Control	OpSrtC
$\tau_{W50\%}$ (Pa)	28.3 ± 5.1	Not reached	3.7 ± 1.9	12.4 ± 1.9

Table 3. Effect of the rinsing step with PBS buffer ($\tau_w=0.03$ Pa) after the 3-h adhesion phase for piliated and non-piliated *L. lactis* strains, attached to bare (PS) or PGM-coated (PS+PGM) polystyrene surfaces. The given results are the average value and standard deviation over three independent coupons and separately grown cultures.

Surface	PS		PS+PGM	
		<i>L. lactis</i>		<i>L. lactis</i>
Strain	Control	OpSrtC	Control	OpSrtC
A_i before PBS buffer rinsing (%)	3.2 ± 1.2	2.6 ± 0.4	3.0 ± 1.1	2.0 ± 0.2
A_0 after PBS buffer rinsing (%)	2.6 ± 1.1	2.6 ± 0.4	2.0 ± 1.1	0.7 ± 0.1
A_0/A_i (%)	82.1 ± 1.3	98.3 ± 1.5	67.2 ± 18.5	37.1 ± 6.5

FIGURE CAPTIONS

Figure 1. Histograms of interaction forces in PBS buffer between bare polystyrene (PS) and lacto-probes of the control (in blue) (a) and *L. lactis* OpSrtC (in red) (b).

Figure 2. Histograms of interaction forces in PBS buffer between PGM-coated polystyrene (PS+PGM) before (a, b) and after (a', b') incubation of the lacto-probe with free PGM for the control (in blue) (a, a') and *L. lactis* OpSrtC (in red) (b, b'). A schematic representation of the blocking assay with free PGM is also presented.

Figure 3. Histogram of rupture distances in interactions measured by AFM in PBS buffer between *L. lactis* OpSrtC and PGM-coated polystyrene (PS+PGM). Some examples of typical force-distance curves are also given.

Figure 4. Shear-flow induced detachment profiles of piliated and non-piliated *L. lactis* strains attached to bare polystyrene (PS) in PBS buffer; (●) *L. lactis* OpSrtC; (□) control. The given results are the average value and standard deviation over three independent coupons and separately grown cultures.

Figure 5. Shear-flow induced detachment profiles of piliated and non-piliated *L. lactis* strains attached to PGM-coated polystyrene (PS+PGM) in PBS buffer; (●) *L. lactis* OpSrtC; (□) control. The given results are the average value and standard deviation over three independent coupons and separately grown cultures.

Figure 6. Representative images of *L. lactis* bacteria attached to bare polystyrene (PS) in PBS buffer and subjected to increasing wall shear stress (a, a') 0.04 Pa, (b, b') 5 Pa, (c, c') 20 Pa, (d, d') 50 Pa in the shear stress flow chamber; (a, b, c, d) control; (a', b', c', d') *L. lactis* OpSrtC. The scale bar is 5 μm .

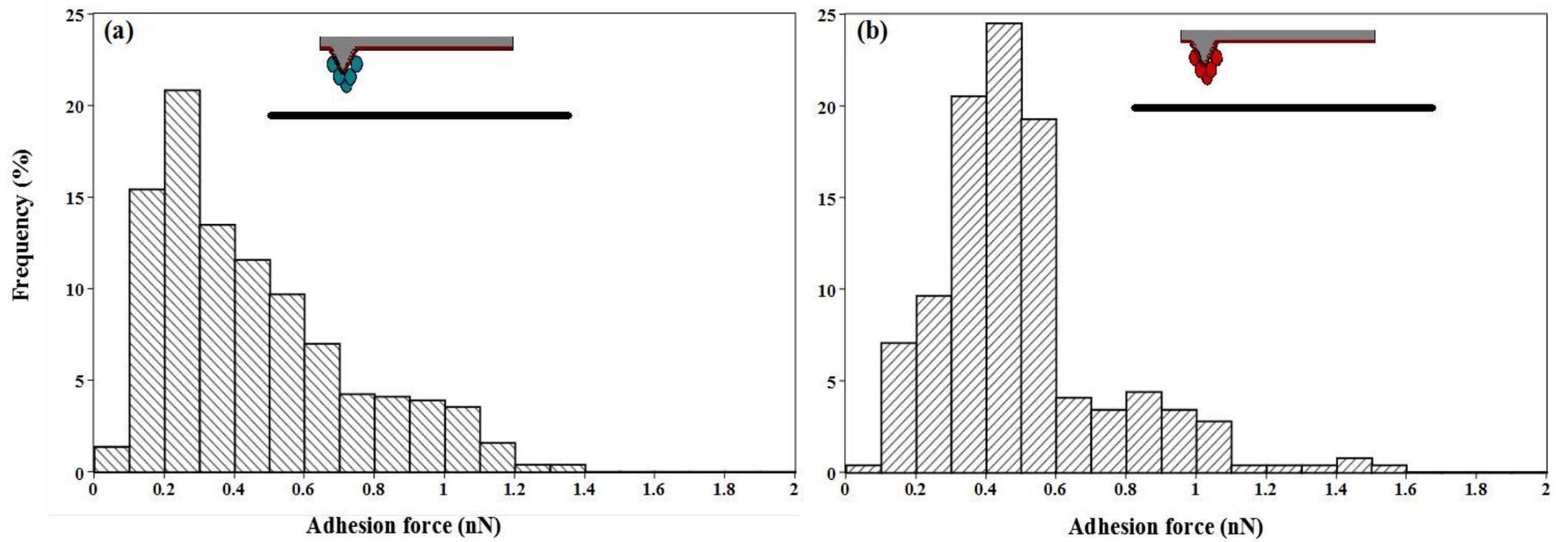


Figure 1

D. T. L. Le *et al.*

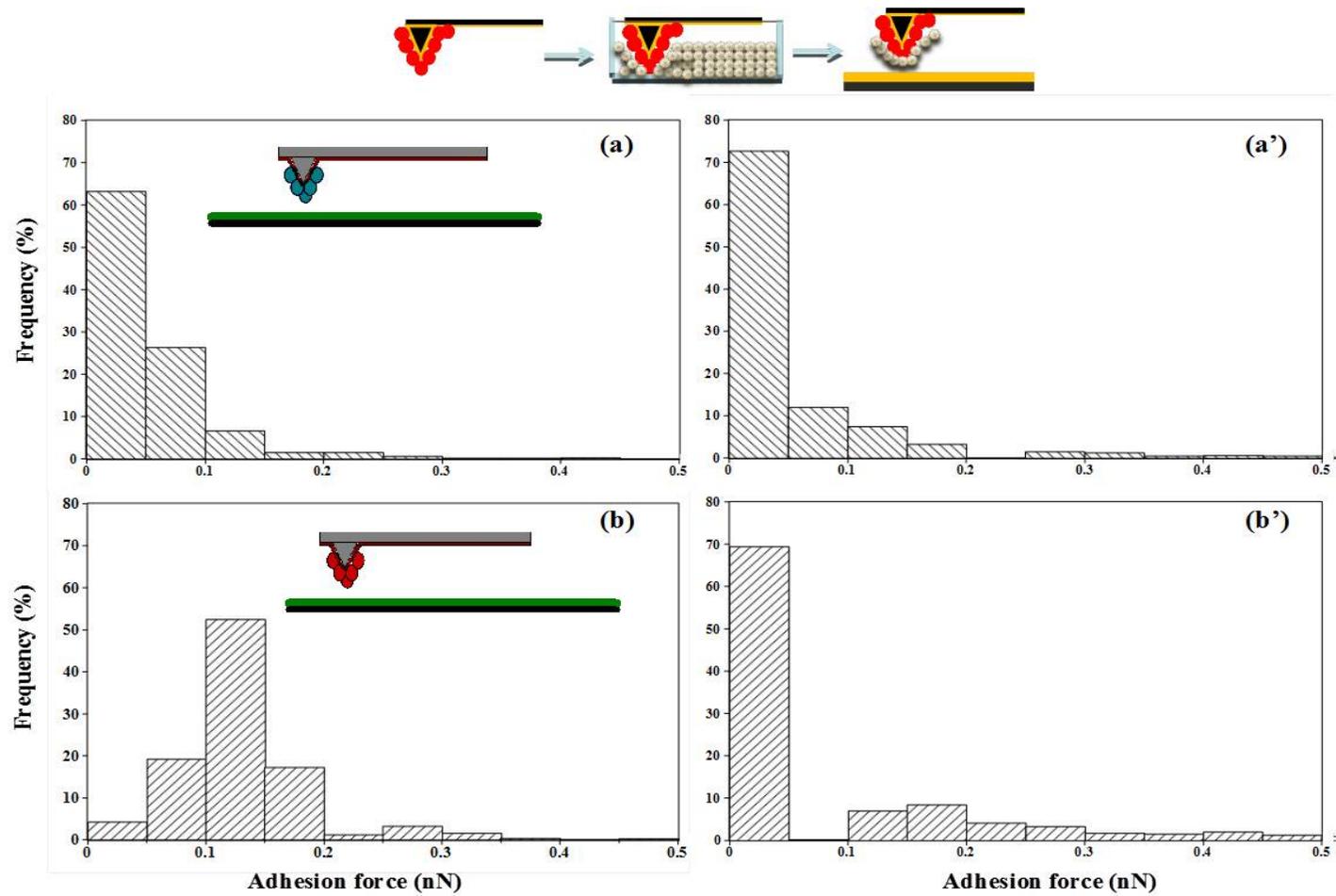


Figure 2

D. T. L. Le *et al.*

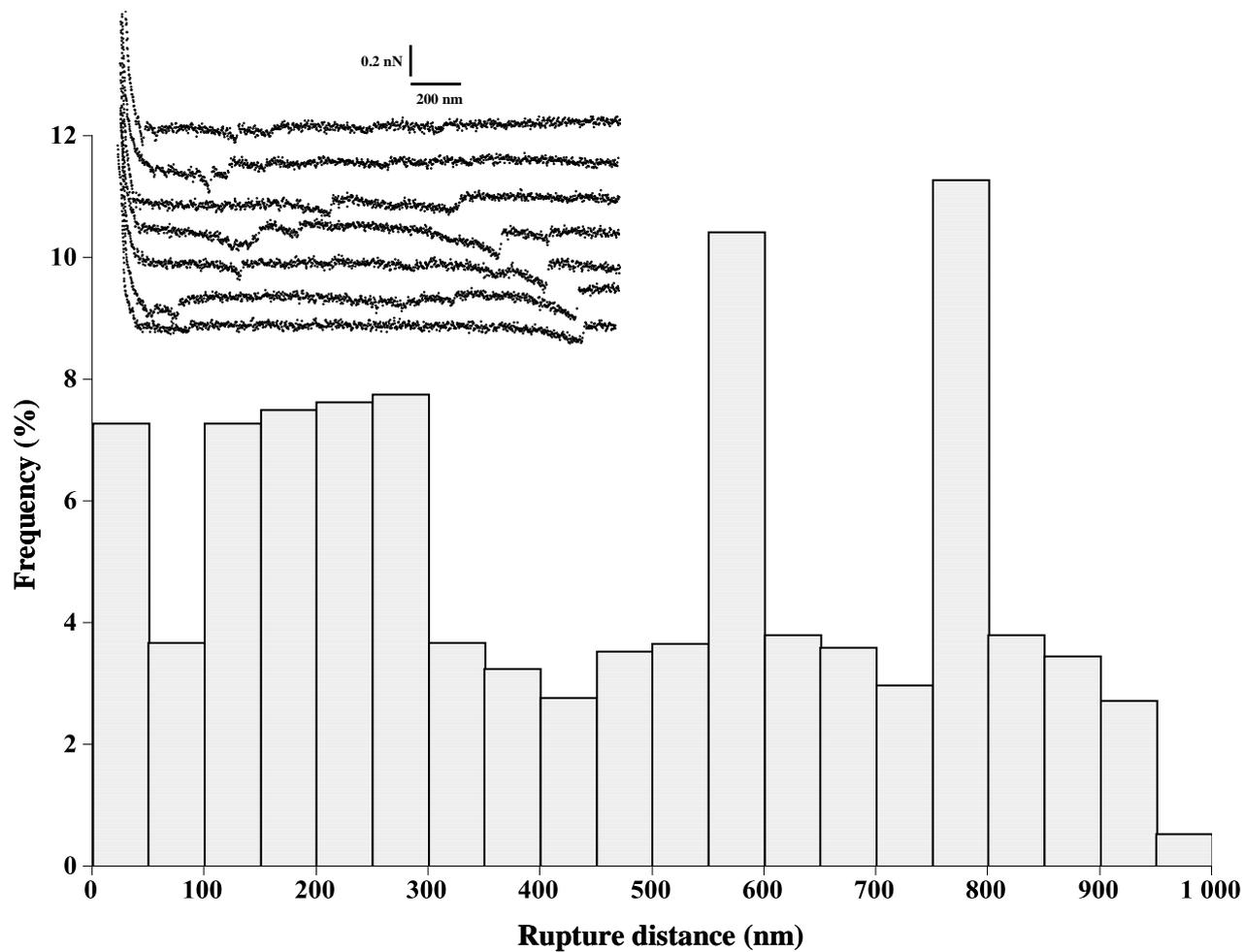


Figure 3

D. T. L. Le *et al.*

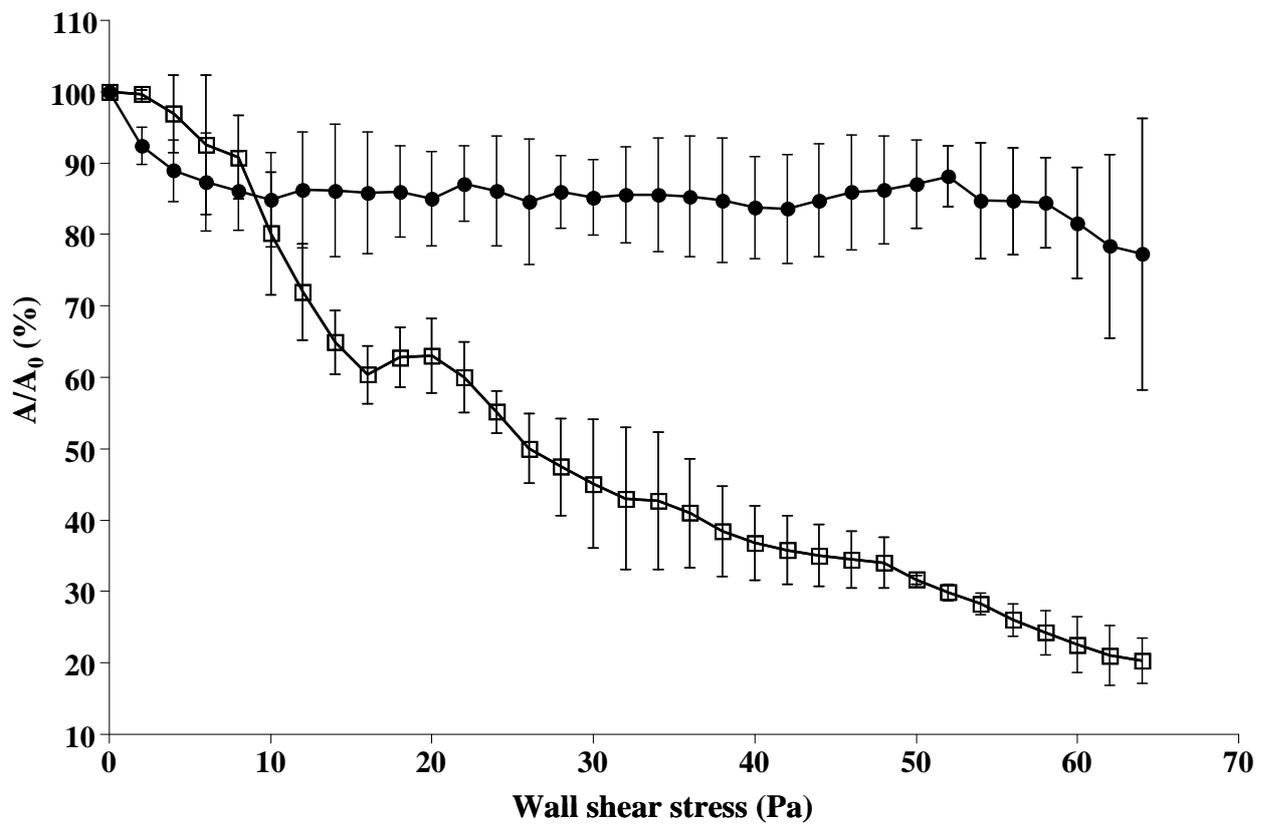


Figure 4

D. T. L. Le *et al.*

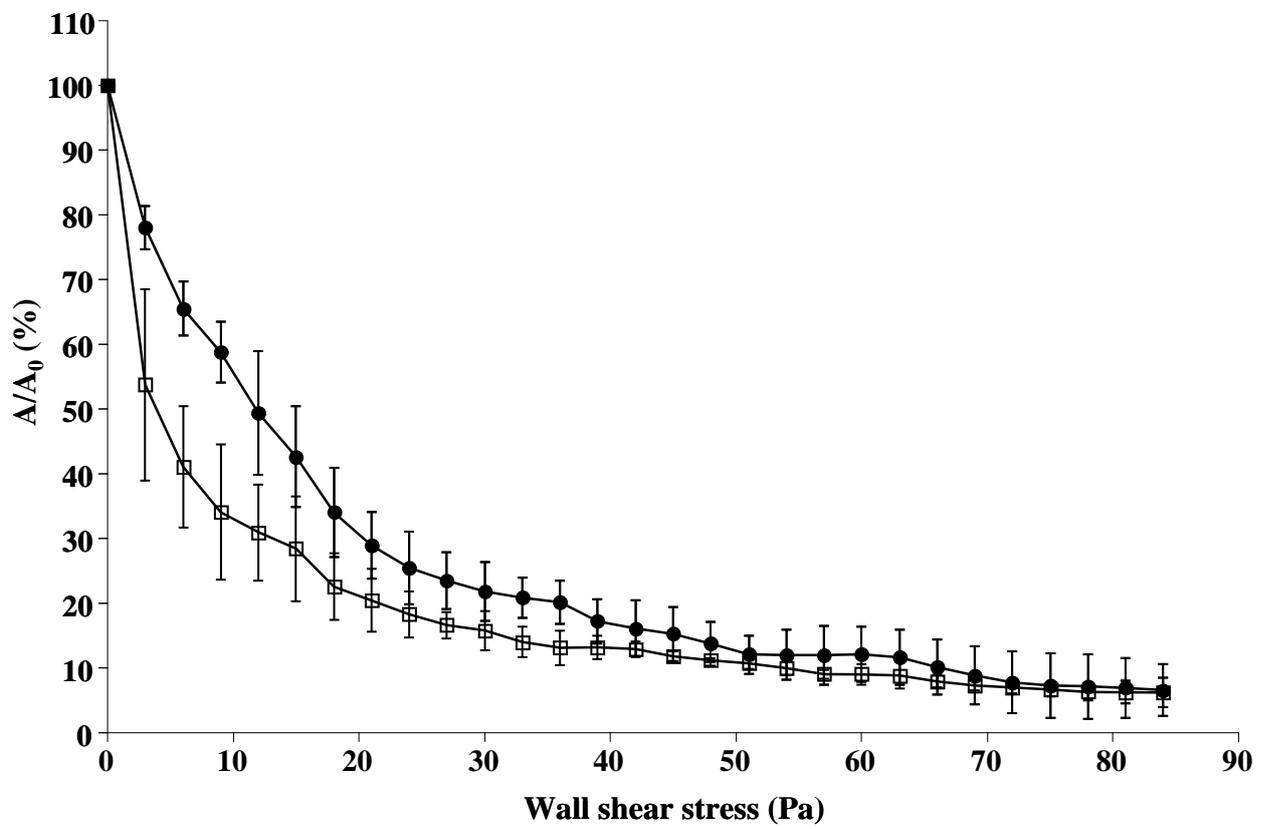


Figure 5

D. T. L. Le *et al.*

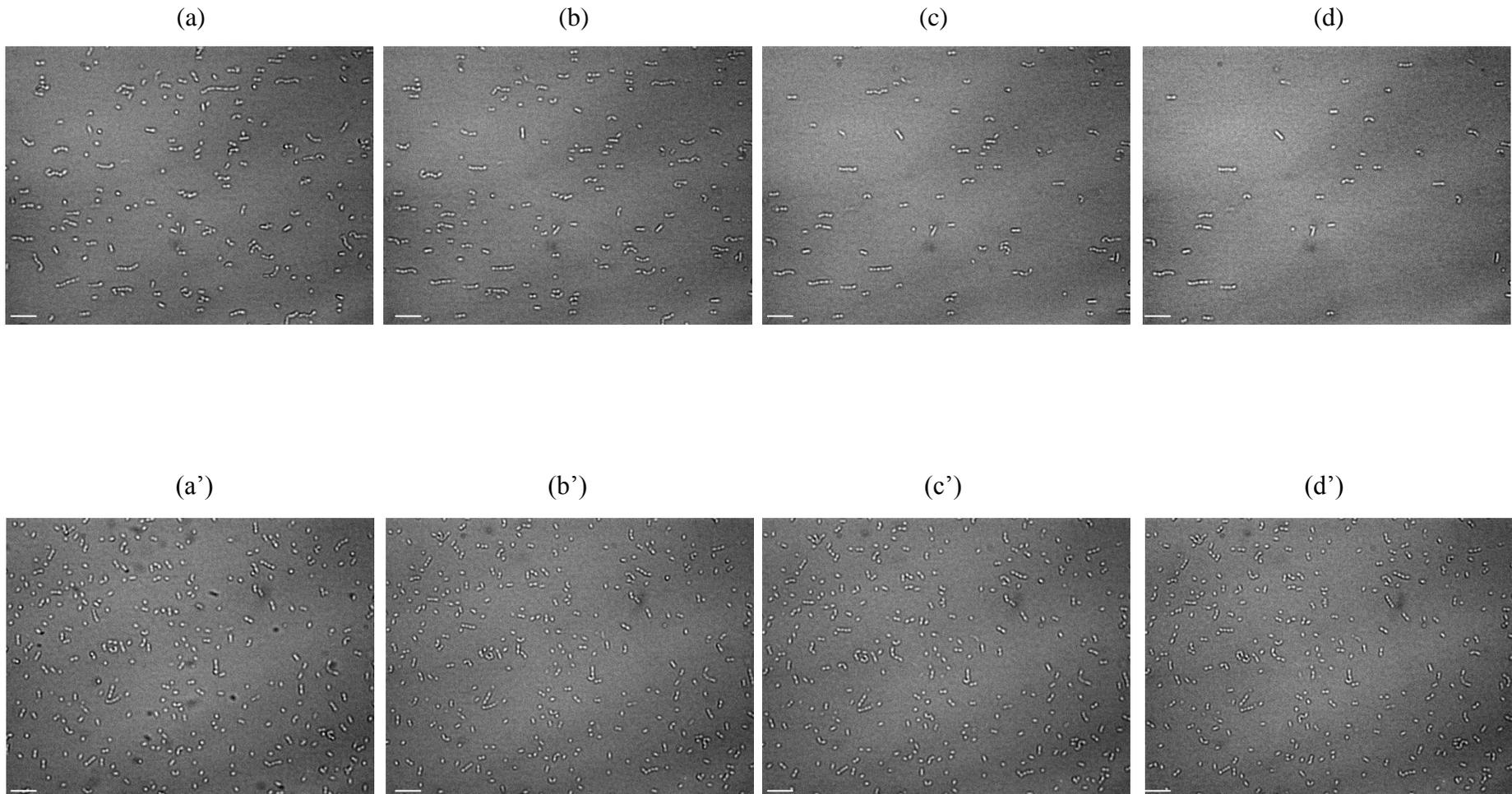
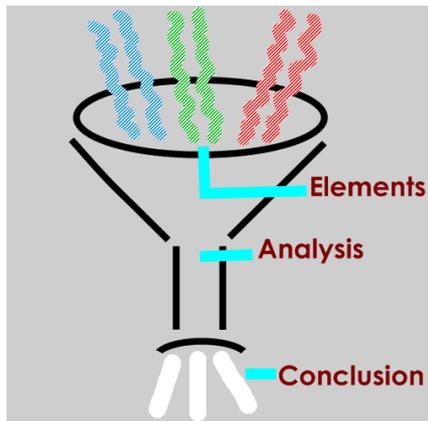


Figure 6

D. T. L. Le *et al.*

Partie IV - Synthèse des résultats, Discussion générale et Perspectives



1. Synthèse des résultats et discussion générale

Afin d'aboutir à une compréhension mécanistique fine des interactions entre les bactéries lactiques et l'épithélium intestinal de l'hôte, nous avons choisi de travailler sur la bactérie modèle *L. lactis*. Comme nous l'avons abordé dans la partie *Synthèse bibliographique*, cette bactérie est, de manière traditionnelle, largement utilisée dans l'industrie alimentaire. Elle possède toutefois des potentialités intéressantes à l'intersection alimentation/santé, pour l'élaboration d'aliments fonctionnels (probiotiques (Yadav, *et al.*, 2009)) ou encore comme cible thérapeutique (vaccins vivants (Neutra & Kozlowski, 2006), délivrance de molécules d'intérêt médical (Wells & Mercenier, 2008)). Des études récentes démontrent la grande biodiversité au sein de l'espèce *L. lactis*. Des souches d'origine diverse (laitières *vs.* environnementales) présentent des propriétés physico-chimiques de surface (Giaouris, *et al.*, 2009) ainsi que des caractéristiques génétiques et génomiques différentes (Passerini, *et al.*, 2010). Une telle diversité offre un large spectre de phénotypes pour *L. lactis*, la muco-adhésion restant à ce jour un paramètre peu décrit et mal compris au sens mécanistique. Il était donc crucial d'obtenir une meilleure compréhension des processus d'interaction entre *L. lactis* et la couche de mucus intestinal, en se concentrant sur l'une de ses principales composantes : les mucines. Ces glycoprotéines de haut poids moléculaire jouent un rôle important au niveau du tractus gastro-intestinal : elles conditionnent à la fois les propriétés viscoélastiques du gel de mucus et les interactions biologiques entre l'hôte et le microbiote endogène ou exogène (bactéries commensales, probiotiques ou pathogènes) (Mack, *et al.*, 1999 ; McGuckin, *et al.*, 2011).

Pour répondre à cette problématique scientifique, une démarche pluridisciplinaire (microbiologie, physique, chimie) a été mise en place. Les approches développées reposent sur la mise à profit des potentialités de différentes techniques multi-échelles (macro-, micro- et nano-scopiques). Ces techniques ont été utilisées pour caractériser l'adhésion *in vitro* entre *L. lactis* et la mucine modèle PGM (« Pig Gastric Mucin »), largement décrite dans la littérature tant du point de vue structural que fonctionnel (Nordman, *et al.*, 1997 ; Deacon, *et al.*, 2000). A ce jour, les réelles forces d'adhésion des bactéries aux mucines restent largement méconnues. Nous avons ainsi utilisé, pour la première fois dans littérature, l'AFM (microscopie à force atomique) en particulier le mode de spectroscopie de force pour quantifier directement la force d'interaction entre *L. lactis* et PGM. Pour atteindre cet objectif,

nous avons développé (i) une surface biomimétique à base de PGM adsorbée sur une surface abiotique de polystyrène (PS) et (ii) une pointe AFM fonctionnalisée par les bactéries (« lacto-pointe ») par immobilisation électrostatique *via* le polyéthylène-imine (PEI). La viabilité des bactéries après fixation a été vérifiée à l'aide d'un marqueur fluorescent spécifique. Dans notre **première publication parue en 2010 dans *Langmuir***, nous avons validé sur la souche de référence *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1820 cette méthode de quantification directe des interactions *L. lactis*/mucines à l'échelle de la cellule unique. La couche de PGM adsorbée (PS+PGM) a été caractérisée par des techniques d'analyse multi-échelles : méthode de la goutte posée (caractère hydrophile/hydrophobe), spectroscopie de photoélectrons induits par rayons X – XPS (composition moléculaire, épaisseur), microscopie électronique à balayage – MEB et AFM (topographie, taux de recouvrement, propriétés nanomécaniques). La couche de PGM est homogène et continue, avec une épaisseur de 3,4 nm (déterminée à partir des données XPS). La présence de cette couche se traduit par une augmentation de l'hydrophilie de surface (diminution de l'angle de contact avec l'eau de $98,5^\circ \pm 2,9^\circ$ à $58,5^\circ \pm 5,7^\circ$). Par ailleurs, les images MEB montrent une immobilisation satisfaisante des cellules de *L. lactis* sur la pointe AFM, essentiellement en raison de leur charge négative élevée. Nous avons en effet déterminé, par micro-électrophorèse, la mobilité des bactéries sous l'effet de l'application d'un champ électrique. A noter que ce type de mesure reflète la charge de l'interface mais aussi la perméabilité hydrodynamique (Dague, *et al.*, 2006). La mobilité électrophorétique est d'environ $-3,8 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$ à pH=7. De plus, le point isoélectrique pI est très bas (pI < 2), probablement du fait de la présence en surface d'acides téichoïques. Enfin, la force d'adhésion *L. lactis*/PGM a été déduite de l'analyse des courbes de retrait obtenues par AFM. Après adsorption de PGM, les niveaux de force sont plus faibles. Par exemple, les forces d'adhésion de la souche MG1820 à PS et PS+PGM sont respectivement de $0,74 \pm 0,10$ nN et de $0,12 \pm 0,06$ nN. Cette propriété anti-adhésive de la couche de PGM est due à l'action combinée des répulsions électrostatique, hydrophile et stérique, induites par la structure complexe de la mucine. Nous avons pu également discriminer les contributions des forces d'interaction non spécifiques (forces électrostatiques, hydrophobes, van der Waals) et spécifiques (sites de liaison multiples des bactéries et/ou étirement des molécules de PGM). En effet, les courbes de force sur PS+PGM ont, dans certains cas, une allure différente de celles observées sur PS, qui traduit des interactions propres aux liaisons ligand-récepteur. La caractéristique de ce type de courbe est le changement de pente lors du retrait de la pointe. Au tout début du processus de retrait, le levier est détendu puis, dans le cas d'une interaction ligand-récepteur, il a tendance à

s'allonger et s'étirer. En revanche, pour une interaction non spécifique, la courbe conserve la même pente sur l'ensemble du processus de retrait.

Dans la continuité de cette première étude, nous avons comparé les propriétés muco-adhésives de deux souches *L. lactis* de la sous-espèce *cremoris* : la souche de référence MG1820, décrite précédemment, et la souche IBB477, d'origine laitière et qui présente une forte persistance *in vivo* dans le tractus digestif du rat (Boguslawska, *et al.*, 2009). Cette démarche fait l'objet de notre **deuxième publication parue en 2011 dans *Biophysical Journal***, où nous avons plus particulièrement exploré la dynamique des interactions biologiques *L. lactis*/PGM. Les résultats AFM entre la lacto-pointe et la couche de PGM ont été comparés pour MG1820 et IBB477. Pour la souche MG1820, 45 % des courbes de force correspondent à des événements non adhésifs, tandis que 50 % des courbes de force sont caractéristiques d'interactions physico-chimiques non spécifiques. Seulement 5 % des courbes de force ont été attribuées à des événements adhésifs spécifiques. En revanche, pour la souche IBB477, presque toutes les courbes de force (99 %) correspondent à des événements adhésifs et 20 % des courbes de force peuvent être attribuées à des interactions spécifiques. En conséquence, la force d'adhésion de la souche IBB477 à PGM est significativement plus élevée que celle obtenue pour MG1820 ($0,22 \pm 0,05$ contre $0,12 \text{ nN} \pm 0,06 \text{ nN}$), malgré des propriétés de surface équivalentes (charge, hydrophobie). Ce comportement peut être relié, du moins en partie, à la persistance de la souche IBB477 *in vivo* dans le tractus gastro-intestinal du rat. Au travers de ces résultats, nous pouvons affirmer que la vision traditionnelle de la couche de mucus comme une « simple » barrière physique doit désormais évoluer pour inclure des processus biologiques complexes où les mucines jouent un rôle central et stratégique vis-à-vis des bactéries.

La faible adhésion de MG1820 peut s'expliquer par l'existence d'un nombre réduit de protéines à domaines MUB chez les lactocoques comparativement aux lactobacilles, eux naturellement présents dans le microbiote intestinal. A titre d'exemple, chez *L. lactis* MG1363, on ne retrouve qu'une protéine codée par le gène *llmg_2465* et dotée uniquement de 3 domaines MUB (pas de peptide signal). En revanche, chez *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323, 13 protéines avec de 4 à 10 domaines MUB ont pu être identifiées (Boekhorst, *et al.*, 2006). La recherche des déterminants moléculaires impliqués chez IBB477 (protéine(s) à domaines MUB, autres...) est en cours à l'Institut de Biochimie et de Biophysique de Varsovie (partenaire polonais du projet).

Pour vérifier la spécificité des interactions mises en évidence entre la lacto-pointe et PGM, nous avons effectué des expériences de blocage avec PGM, puis uniquement avec sa partie O-glycannique, en collaboration avec l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle de Villeneuve d'Ascq. Pour MG1820 ainsi que pour IBB477, le pourcentage des événements non adhésifs augmente, respectivement, de 45 % à 81 % et de 1 % à 81 %. Cela indique que les forces d'adhésion mesurées avec la lacto-pointe sont réellement spécifiques des interactions *L. lactis*/PGM. L'inhibition de l'adhésion est moins nette avec les O-glycannes seuls : pour MG1820 et IBB477, le pourcentage des événements non adhésifs atteint 71 % et 48 %, respectivement. Ceci démontre que la partie oligosaccharidique de PGM joue un rôle, certes, important mais non exclusif dans le processus d'interaction IBB477/PGM. Nous sommes ensuite intéressés à la dynamique de ces interactions, en faisant varier les paramètres AFM (vitesse au retrait, temps de contact) pour *in fine* estimer la constante cinétique de dissociation (K_{off}) et la constante cinétique d'association (K_{on}). Selon la théorie thermodynamique (Evans & Ritchie, 1997), la force d'adhésion au retrait, correspondant à une interaction biologique spécifique, est fonction de la vitesse de retrait de la pointe. En d'autres termes, plus la pointe est retirée rapidement, plus la force d'interaction est élevée. Au contraire, les interactions physico-chimiques non spécifiques (électrostatiques, (a)polaires...) ne sont pas supposées être influencées par une modification de la vitesse au retrait. Le tracé de l'évolution de la force d'adhésion mesurée pour IBB477 en fonction de la vitesse au retrait a confirmé ces prédictions théoriques puisque, dans le cas de la composante spécifique, nous avons observé une relation directe entre les paramètres vitesse au retrait et force d'adhésion. En revanche, pour la contribution non spécifique, aucune variation de la force n'a été obtenue. Sur cette base, nous avons pu évaluer la constante cinétique de dissociation pour IBB477. La valeur estimée (K_{off} de $0,46 \text{ s}^{-1}$) est comparable aux données de la littérature sur les interactions entre sucres et protéines. Ce dernier résultat renforce l'idée d'une interaction préférentielle entre la partie O-glycannique de PGM et *L. lactis*, via une (des) protéine(s) de la surface bactérienne.

Pour élargir le panel de souches testées et ainsi approfondir nos connaissances sur le(s) processus muco-adhésif(s) chez *L. lactis*, nous avons testé la souche naturelle TIL448, de la sous-espèce *lactis* et d'origine végétale, en collaboration avec l'Institut MICALIS de Jouy-en-Josas). Des travaux antérieurs avaient permis de démontrer le caractère « atypique » de cette souche : forte hydrophobie de surface et adhésion élevée au polystyrène (Giaouris *et al.*, 2009), adhésion spécifique aux cellules épithéliales intestinales Caco-2, en lien avec la

présence d'une protéine à domaine « MUB-like » et de pili (Chapot-Chartier *et al.*, résultats non publiés). Ce travail nous a ainsi permis de mieux appréhender les déterminants moléculaires de la surface bactérienne impliqués dans la muco-adhésion. Les propriétés d'interaction avec PGM ont été sondées par AFM en adoptant la méthodologie mise en place précédemment sur MG1820 et IBB477. Nous avons comparé la souche TIL448 et la souche dérivée TIL1230 (élimination des plasmides par l'acridine orange). Les résultats ont montré une nette différence dans les propriétés adhésives de ces deux souches vis-à-vis de PGM. TIL448 présente 2 % d'événements non adhésifs tandis que, pour TIL1230, ce pourcentage augmente de manière drastique (37 %). De plus, un pourcentage très important d'événements adhésifs spécifiques (60 %) est observé chez TIL448, de manière encore plus marquée que pour IBB477 (20 %). La souche TIL1230 présente, quant à elle, seulement 8 % d'événements adhésifs spécifiques (pourcentage proche de celui obtenu avec la souche MG1820). Ces résultats sont à rapprocher de ceux décrivant l'adhésion préférentielle de la souche TIL448 aux cellules Caco-2 par rapport à TIL1230 (Chapot-Chartier *et al.*, résultats non publiés). Nous avons également observé que, pour TIL448, les distances de rupture, paramètre directement extrait des courbes de force – distance relatives aux événements adhésifs spécifiques, sont aussi bien courtes (100-200 nm) que longues (jusqu'à 600-800 nm). Pour élucider le rôle respectif joué par les déterminants de surface (pili, protéine à domaines « MUB-like »), nous avons ensuite réalisé des expérimentations complémentaires sur deux souches mutantes, construites à façon (Chapot-Chartier *et al.*, résultats non publiés) : le mutant dans le gène piline TIL1289 et le mutant dans le gène codant pour la protéine à domaines « MUB-like » TIL1290. Les interactions avec PGM mesurées par AFM sont plus faibles qu'avec la souche originale. En effet, les deux mutants présentent un pourcentage d'événements non adhésifs plus important que celui décrit pour TIL448. De manière corrélée, la proportion d'événements adhésifs spécifiques est moindre (26 % et 29 % pour TIL1289 et TIL1290, respectivement contre 60 % pour TIL448). La contribution quasi-identique pour les deux mutants démontre que la protéine à domaines « MUB-like » et les pili sont impliqués de manière équivalente dans les interactions spécifiques entre TIL448 et PGM. Nous avons, par ailleurs, examiné individuellement les courbes de force propres aux événements spécifiques puis analysé les distances de rupture correspondantes, pour caractériser les propriétés d'élongation des composés de surface impliqués. Pour la souche TIL1289, les événements à longue distance de rupture disparaissent au profit de ceux à courte distance, et inversement pour la souche TIL1290. Les événements à courte distance sont donc caractérisés par l'interaction de la protéine à domaines « MUB-like » avec PGM. Ceux à longue distance

traduisent, quant à eux, l'implication des pili dans le processus muco-adhésif chez *L. lactis*, comme démontré précédemment dans la littérature pour *L. rhamnosus* GG (LGG), avec à la clé une implantation prolongée, voire stable, dans le tractus gastro-intestinal (von Ossowski, *et al.*, 2010). Dans le même ordre d'idées mais plutôt dans l'optique de caractériser les polysaccharides de surface présents chez LGG (nature, conformation, distribution spatiale), Francius *et al.* (Francius, *et al.*, 2008) ont analysé les distances de rupture à partir des courbes force-distance obtenues en sondant les interactions entre la surface de LGG et des pointes AFM fonctionnalisées avec les lectines concanavaleine A (Con A) et de *Pseudomonas aeruginosa* (PA-1), spécifiques du mannose/glucose et du galactose, respectivement. L'interaction de Con A avec les polysaccharides riches en mannose/glucose en surface se traduit par des distances de rupture allant de 20 à 400 nm, tandis que les distances de rupture plus longues (100-1000 nm) sont, elles, caractéristiques des polysaccharides riches en galactose. Ces observations ont conduit à une proposition d'organisation structurale et spatiale des polysaccharides en surface de LGG (Francius, *et al.*, 2008).

Nous avons également effectué des tests de blocage pour TIL448 avec les O-glycannes (totalité puis fractions acide et neutre). Contrairement à ce qui avait été observé pour IBB477, les O-glycannes permettent ici de bloquer quasiment toutes les interactions entre les bactéries et PGM (76%), avec une contribution majoritaire de la fraction neutre (blocage de 42 % contre 11 % pour la fraction acide). La caractérisation des différentes fractions est en cours de réalisation, dans le cadre de la collaboration avec l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle de Villeneuve d'Ascq.

Pour valider les tendances observées à l'échelle de la cellule unique par AFM (mode statique) et nous rapprocher de l'environnement *in vivo*, nous avons déterminé les interactions entre *L. lactis* et PGM à l'échelle de l'ensemble de la population bactérienne, en conditions dynamiques, avec la mise en œuvre successive de la microbalance à quartz à mesure de dissipation (QCM-D) et la chambre à écoulement cisailé. A noter qu'à notre connaissance, il n'existe aucune donnée de la littérature sur la quantification de l'adhésion des BL par QCM-D ou en chambre à écoulement cisailé.

Dans notre **troisième publication soumise à *Langmuir***, la QCM-D a donc, pour la première fois, été utilisée pour caractériser la muco-adhésion de *L. lactis*. Nous nous sommes concentrés sur la dynamique de l'interface que constituent les bactéries adhérentes et la couche de PGM. La mesure simultanée des changements de la fréquence de résonance (Δf) et de la

dissipation (Δf) sur un cristal recouvert de polystyrène a tout d'abord démontré un processus d'adsorption de PGM en deux phases, correspondant à la transition entre un film rigide et un film plus mou et dissipatif. L'analyse par XPS a confirmé la présence de PGM sur le cristal de quartz. Le modèle viscoélastique de Voigt (Voinova, *et al.*, 2002) a ensuite été utilisé pour décrire les données de QCM-D en termes de propriétés mécaniques de la couche de PGM (épaisseur, modules visqueux et élastique). L'étape d'adsorption de PGM se traduit par une couche d'épaisseur de 15 nm, avec une viscosité et un module élastique de $1,1 \times 10^{-3}$ Pa.s et $0,3 \times 10^5$ Pa, respectivement. Après rinçage avec le tampon PBS (étape introduite pour mimer les conditions de préparation de la surface fonctionnalisée par PGM lors des tests d'adhésion bactérienne), l'épaisseur prédite diminue de 15 nm à 4 nm avec une multiplication par 3 de la viscosité ($2,9 \times 10^{-3}$ Pa.s) et une multiplication par un facteur voisin de 10 du module élastique (variable entre 4×10^5 et 5×10^5 Pa). L'augmentation de ces deux paramètres, corrélée à la diminution de l'épaisseur, peut s'expliquer par le passage d'un film mou de type hydrogel à un film compact et rigide. De plus, l'épaisseur modélisée est en accord avec la valeur expérimentale, mesurée par AFM (3,15 nm).

L'adhésion des souches IBB477 et MG1820 au cristal recouvert de PGM a ensuite été suivie par QCM-D en combinaison avec le comptage direct des cellules attachées par microscopie à épifluorescence. La comparaison avec le polystyrène vierge a également été effectuée. Pour les deux surfaces (*i.e.*, avec et sans adsorption préalable de PGM), des variations de fréquence positives ont été observées lors de l'adhésion des bactéries. Cela s'explique vraisemblablement par la théorie de l'« oscillateur couplé », récemment décrite dans la littérature pour *S. epidermidis* (Olsson, *et al.*, 2011). La présence de PGM adsorbée réduit fortement l'adhésion des bactéries par rapport au substrat vierge, ce qui est cohérent avec les résultats obtenus par AFM. Cependant, l'adhésion de la souche IBB477 à PGM est significativement supérieure à celle observée pour MG1820 (changement de Δf et du nombre de cellules attachées plus important, ratio $\Delta D/\Delta f$ plus élevé). Cela confirme les résultats décrits à l'échelle de la cellule unique par AFM.

Nous avons poursuivi notre étude sur l'effet des conditions hydrodynamiques appliquées à la muco-adhésion bactérienne, l'objectif ici étant de relier les échelles cellule unique *vs.* population entière, pour *in fine* modéliser le processus d'interaction *L. lactis*/PGM pour les souches IBB477 et MG1820. La chambre à écoulement cisailé a alors été mise en œuvre pour suivre *in situ* le détachement des bactéries adhérentes, dans des conditions

d'écoulement laminaire contrôlées. L'observation directe du comportement bio-adhésif des bactéries par microscopie optique, à différents débit de circulation, combinée au traitement ultérieur des images obtenues, permet d'accéder à plusieurs grandeurs caractéristiques comme par exemple la contrainte de cisaillement nécessaire au détachement de 50 % des bactéries initialement attachées ($\tau_{P50\%}$) (Mercier-Bonin, *et al.*, 2011). Pour la souche peu-adhésive MG1820 et la surface PS+PGM, le paramètre $\tau_{P50\%}$ est de $3,8 \pm 2,9$ Pa. Pour la souche adhésive IBB477, $\tau_{P50\%}$ est nettement plus élevé et atteint $54,2 \pm 15,8$ Pa. Les profils de détachement pour ces deux souches sont en accord avec les résultats obtenus précédemment par QCM-D (tant sur PS vierge que sur PS+PGM). Nous avons ensuite modélisé la force d'adhésion entre *L. lactis* et PGM grâce à une approche théorique, développée antérieurement au LISBP. Ce modèle se base sur l'équilibre des forces et moments hydrodynamiques s'exerçant sur la particule adhérente, soumise à l'écoulement cisailé (Lorthoï, *et al.*, 2001 ; Mercier-Bonin, *et al.*, 2011). Pour fournir certaines données nécessaires à la modélisation, les propriétés nanomécaniques des interfaces cellulaires ont été mesurées par AFM pour MG1820 et IBB477. Les courbes d'indentation entre la pointe AFM et la paroi bactérienne ont été analysées en utilisant le modèle de Hertz. Les modules de Young (E) ont ainsi été mesurés. Ils atteignent $9,1 \pm 4,2$ MPa et $4,8 \pm 2,6$ MPa pour IBB477 et MG1820, respectivement. Les bactéries peuvent donc être considérées comme rigides et non déformables. Les forces d'adhésion à PGM ont ensuite été modélisées et atteignent $0,16 \pm 0,18$ nN et $2,06 \pm 1,46$ nN, pour MG1820 et IBB477, respectivement. La force d'adhésion pour MG1820 est cohérente avec celle mesurée par AFM ($0,16 \pm 0,18$ nN contre $0,12 \pm 0,02$ nN). En revanche, nous notons un écart important entre les valeurs expérimentale et modélisée pour IBB477 ($2,06 \pm 1,46$ nN contre $0,22 \pm 0,05$ nN), probablement en raison de la contribution plus importante des interactions spécifiques. En intégrant ces différents niveaux de force (force élémentaire en AFM vs. force « moyennée » sur la zone de contact en chambre à écoulement cisailé), nous avons pu estimer une densité de liaisons entre la surface bactérienne et PS+PGM (172×10^{12} liaisons/m²). Il s'agit ici du premier exemple de couplage entre AFM et chambre à écoulement cisailé pour élucider un processus d'interaction.

Nous avons terminé notre étude par l'évaluation plus précise du rôle des pili dans la muco-adhésion chez *L. lactis* IL1403, en nous focalisant sur la souche piliée *L. lactis* OpSrtC et son contrôle non pilié, en collaboration avec l'Institut MICALIS de Jouy-en-Josas. Nous avons couplé encore une fois l'AFM et la chambre à écoulement cisailé pour confronter les deux échelles d'analyse. Concernant les interactions avec PGM mesurées par AFM, la souche

piliée *L. lactis* OpSrtC présente une adhésion plus importante que la souche contrôle, corrélée à une proportion d'événements non adhésifs fortement réduite (4 % contre 64 %, respectivement). En outre, la force d'adhésion ($0,12 \pm 0,06$ nN) est en accord avec les valeurs décrites dans la littérature pour la mesure des interactions entre pili et surface réceptrice par AFM ou instrumentation de pince optique. Par ailleurs, le rôle spécifique des pili dans l'interaction avec PGM a été retrouvé avec, comme pour TIL448 et TIL1290, de longues distances de rupture (jusqu'à 800 nm). Ces résultats ont ensuite été confirmés en chambre à écoulement cisailé. Ainsi, la présence de pili sur la surface bactérienne favorise l'adhésion aux surfaces PS et PS+PGM, avec une aptitude moindre au détachement et à la ré-orientation sous cisaillement. Nous avons également observé que, pour une contrainte de cisaillement très faible de l'ordre de 0,03 Pa, la souche piliée est plus sensible au détachement que le contrôle non pilié. Néanmoins, pour des contraintes supérieures, le comportement tend à s'inverser. Dans la littérature, les auteurs ont précédemment décrit le phénomène de « shear-enhanced microbial adhesion », notamment chez une souche piliée d'*E. coli* (Thomas, *et al.*, 2004). Chez cette bactérie, l'interaction entre l'adhésine de type *fimbriae* (FimH) et son ligand, le mannose, dépend également des conditions hydrodynamiques avec un renforcement de l'adhésion pour une contrainte de cisaillement pariétale croissante, selon la formation de liaisons de type « catch bond ». Les hypothèses envisagées pour expliquer ce mécanisme sont les suivantes : (i) transition d'une conformation à faible affinité à une conformation d'affinité plus élevée de l'adhésine pour son récepteur, (ii) rapprochement des deux entités partenaires du fait de l'augmentation de la contrainte. Dans notre cas, des essais complémentaires seront nécessaires pour confirmer ces premières observations (voir ci-après dans la partie Perspectives).

En conclusion, la synthèse et l'analyse des résultats acquis durant ces trois années de thèse résument nos avancées scientifiques dans le domaine de la muco-adhésion chez *L. lactis*. Nous avons travaillé avec un large panel de souches naturelles, ou recombinantes présentant des propriétés muco-adhésives modulées. Cette caractérisation a été effectuée dans un environnement pluridisciplinaire et une logique collaborative. Dans le cadre de ces travaux, nous avons mis au point, validé puis exploré trois techniques parfaitement complémentaires en termes d'échelle, de manière soit indépendante soit couplée : la microscopie à force atomique (AFM), la microbalance à quartz à mesure de dissipation (QCM-D) et la chambre à écoulement cisailé. Nous avons évalué le rôle de trois paramètres importants en AFM : la force d'adhésion, la

probabilité d'adhésion avec la distinction des événements non adhésifs, adhésifs non spécifiques et adhésifs spécifiques, ainsi que la distance de rupture à l'échelle de la molécule unique. La QCM-D nous a permis d'élucider les propriétés viscoélastiques des couches moléculaires adsorbées (PGM) et des dépôts bactériens, en fonction de la surface réceptrice et de la souche testée. Pour identifier le rôle de l'hydrodynamique sur le processus muco-adhésif (aptitude au détachement, mécanismes de ré-orientation sous cisaillement) et se rapprocher de l'environnement *in vivo*, nous avons mis en œuvre la chambre à écoulement cisailé, à l'échelle de la population bactérienne, par des approches à la fois expérimentales et de modélisation. Nous avons, en parallèle, progressé dans l'identification et la caractérisation des déterminants moléculaires impliqués, les deux partenaires - mucine PGM (O-glycannes) et surface bactérienne (protéines à domaines MUB, pili) - ayant été étudiés de manière conjointe.

2. Perspectives du travail

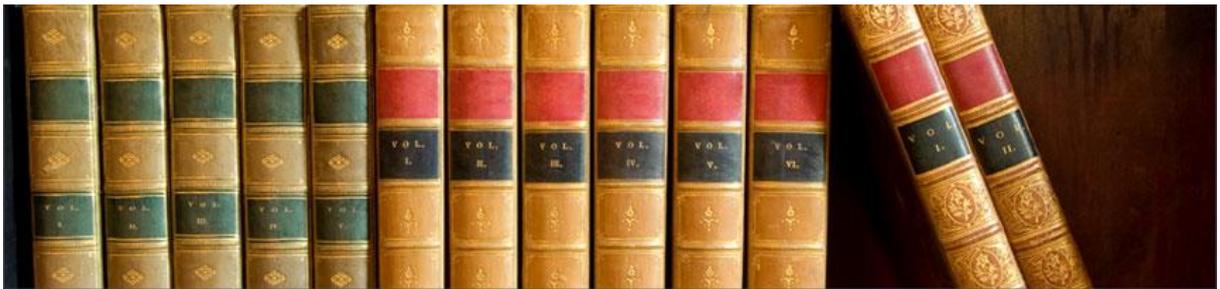
Au niveau mécanistique, il sera intéressant de poursuivre nos travaux sur les déterminants de la surface bactérienne (nature, structure, organisation spatiale) mis en jeu dans la muco-adhésion chez *L. lactis*, avec potentiellement des différences selon les souches considérées. L'identification est d'ailleurs en cours pour IBB477 à l'Institut de Biochimie et de Biophysique de Varsovie (partenaire polonais du projet). De manière parallèle, il s'agira de connaître plus précisément les oligosaccharides de PGM impliqués dans le processus d'interaction avec la surface de *L. lactis* et ce, en fonction du type de composé considéré (protéines à domaines MUB, pili). Outre les essais de blocage réalisés jusqu'alors par AFM avec la lacto-pointe, nous pourrions proposer une démarche alternative, basée sur l'immobilisation des oligosaccharides sur la pointe AFM selon une méthode récemment développée au LAAS, pour cartographier la paroi cellulaire de manière spécifique. En outre, au vu des niveaux de force obtenus (de l'ordre de 100-200 pN) et pour quantifier plus finement les interactions moléculaires entre *L. lactis* et PGM (par exemple pili/O-glycannes), il serait possible d'utiliser une instrumentation de pince optique, actuellement en cours de développement au LISBP. Les techniques de nano-manipulation par pince optique permettent, en effet, la mesure en temps réel de déplacements nanométriques, de forces (de l'ordre de quelques pN) et de contraintes exercées ou produites par des structures moléculaires (Veigel & Schmidt, 2011).

Les expérimentations QCM-D en conditions dynamiques devront également être poursuivies. Concernant les variations de fréquence de résonance positives observées, probablement selon la théorie de l'« oscillateur couplé », nous pourrions tester la souche piliée *L. lactis* OpSrtC (et son contrôle non pilié) de manière à confirmer – ou infirmer – les hypothèses émises dans la littérature sur le rôle des appendices de surface (Olsson, *et al.*, 2009). Au niveau de la chambre à écoulement cisailé, nous envisageons de caractériser la muco-adhésion de la souche TIL448 (pourcentage maximal d'événements adhésifs spécifiques de l'ordre de 60 %), afin de valider notre approche couplée AFM/chambre à écoulement pour l'estimation de la densité de liaisons entre la surface bactérienne et la couche de PGM. Par ailleurs, nous souhaitons approfondir notre étude sur le rôle du cisaillement dans les mécanismes de détachement et de ré-orientation des souches piliées à l'aide d'une caméra

rapide (fréquence d'acquisition jusqu'à 2000 images/s), en relation avec la composition et l'architecture des pili (collaboration avec l'Institut MICALIS de Jouy-en-Josas). Une attention toute particulière sera portée au renforcement potentiel de l'adhésion par l'écoulement, avec des répercussions probables sur la stratégie d'implantation et de maintien des bactéries *in vivo*. A plus long terme, il serait intéressant d'extrapoler notre démarche, mise en œuvre ici sur le modèle PGM, à d'autres types de mucines, plus représentatives de la problématique intestinale comme, par exemple, Muc2 qui présente un profil de glycosylation différent.

En termes applicatifs, après avoir démontré dans ce travail la nécessité d'inclure la muco-adhésion comme paramètre discriminant au sein d'un panel de souches de *L. lactis*, nous pourrions proposer d'inclure ce type de propriété dans les tests de criblage traditionnellement mis en œuvre pour la définition, par exemple, de nouvelles souches probiotiques, en relation toutefois avec les autres critères de sélection (résistance aux stress, adaptation au métabolisme de l'hôte...). Les effets *in vivo* devront également être évalués. Dans ce cadre, une collaboration a récemment été engagée avec l'Unité Toxalim de Toulouse (équipe de Neuro-Gastroentérologie et Nutrition) sur modèle murin pour élucider les interrelations entre bactéries lactiques, muco-adhésion bactérienne et pathologies intestinales (maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, troubles fonctionnels digestifs...).

Références bibliographiques



- Ahimou F, Denis FA, Touhami A & Dufrêne YF (2002) Probing microbial cell surface charges by atomic force microscopy. *Langmuir* **18**: 9937-9941.
- Alcimed (2009) Les probiotiques, un marché qui s'essouffle. *Communiqué de Presse*.
- Allen A (1981) Structure and function of gastrointestinal mucus. *Physiology of the gastroenterology tract*, (Johnson L, ed.), p. 617– 639. Raven Press, New York.
- Alsteens D, Dague E, Rouxhet PG, Baulard AR & Dufrêne YF (2007) Direct measurement of hydrophobic forces on cell surfaces using AFM. *Langmuir* **23**: 11977-11979.
- Andersson M, Andersson J, Sellborn A, Berglin M, Nilsson B & Elwing H (2005) Quartz crystal microbalance-with dissipation monitoring (QCM-D) for real time measurements of blood coagulation density and immune complement activation on artificial surfaces. *Biosens. Bioelectron.* **21**: 79-86.
- Andre G, Leenhouts K, Hols P & Dufrene YF (2008) Detection and localization of single LysM-peptidoglycan interactions. *J. Bacteriol.* **190**: 7079-7086.
- Andrew MD & Simon JT (1999) Hydrogen bonding, hydrophobic interactions, and failure of the rigid receptor hypothesis. *Angew. Chem. Inter. Edit.* **38**: 736-749.
- Archibald AR, Hancock IC & Harwood CR (1993) Cell wall structure, and turnover. *Bacillus subtilis and other Gram-positive Bacteria: Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics*, (Abraham LS, James H & Richard L, ed.), p. 381-409. American Society for Microbiology, Washington DC, U.S.A.
- Argüeso P & Gipson IK (2001) Epithelial mucins of the ocular surface: structure, biosynthesis and function. *Exper. Eye Res.* **73**: 281-289.
- Aspholm-Hurtig M, Dailide G, Lahmann M, *et al.* (2004) Functional adaptation of BabA, the *H. pylori* ABO blood group antigen binding adhesin. *Science* **305**: 519-522.
- Atlan D, Aubel D & Gilbert C (2000) *La biodiversité des bactéries lactiques et les conséquences sur leurs protéinases de surface*. Lavoisier, Paris, France.
- Bahey-El-Din M, Gahan CGM & Griffin BT (2010) *Lactococcus lactis* as a cell factory for delivery of therapeutic proteins. *Curr. Gene Ther.* **10**: 34-45.
- Bailey JE (1991) Toward a science of metabolic engineering. *Science* **252**: 1668-1675.
- Bansil R, Stanley E & Lamont J (1995) Mucin biophysics. *Annu. Rev. Physiol.* **57**: 635-657.
- Baumgartner W, Hinterdorfer P, Ness W, Raab A, Vestweber D, Schindler H & Drenckhahn D (2000) Cadherin interaction probed by atomic force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 4005-4010.
- Beecher C, Daly M, Berry DP, *et al.* (2009) Administration of a live culture of *Lactococcus lactis* DPC 3147 into the bovine mammary gland stimulates the local host immune response, particularly IL-1 and IL-8 gene expression. *J. Dairy Res.* **76**: 340-348.

- Benoit M, Gabriel D, Gerisch G & Gaub HE (2000) Discrete interactions in cell adhesion measured by single-molecule force spectroscopy. *Nat. Cell Biol.* **2**: 313-317.
- Berglin M, Olsson A & Elwing H (2008) The interaction between model biomaterial coatings and nylon microparticles as measured with a quartz crystal microbalance with dissipation monitoring. *Macromol. Biosci.* **8**: 410-416.
- Bergonzelli GE, Granato D, Pridmore RD, Marvin-Guy LF, Donnicola D & Cortesy-Theulaz IE (2006) GroEL of *Lactobacillus johnsonii* La1 (NCC 533) is cell surface associated: potential role in interactions with the host and the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **74**: 425-434.
- Bergstrom KSB, Kissoon-Singh V, Gibson DL, *et al.* (2010) Muc2 protects against lethal infectious colitis by disassociating pathogenic and commensal bacteria from the colonic mucosa. *PLoS Pathog* **6**: e1000902.
- Bermúdez-Humarán LG (2009) *Lactococcus lactis* as a live vector for mucosal delivery of therapeutic proteins. *Human Vaccines* **5**: 264-267.
- Berry M, McMaster TJ, Corfield AP & Miles MJ (2001) Exploring the molecular adhesion of ocular mucins. *Biomacromolecules* **2**: 498-503.
- Binnig G, Quate CF & Gerber C (1986) Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.* **56**: 930-933.
- Boekhorst J, Helmer Q, Kleerebezem M & Siezen RJ (2006) Comparative analysis of proteins with a mucus-binding domain found exclusively in lactic acid bacteria. *Microbiology* **152**: 273-280.
- Boguslawska J, Zycka-Krzesinska J, Wilcks A & Bardowski J (2009) Intra- and interspecies conjugal transfer of Tn916-like elements from *Lactococcus lactis* *in vitro* and *in vivo*. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 6352-6360.
- Boonaert CJP & Rouxhet PG (2000) Surface of lactic acid bacteria: relationships between chemical composition and physicochemical properties. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2548-2554.
- Boshuizen JA, Reimerink JHJ, Korteland-van Male AM, *et al.* (2005) Homeostasis and function of goblet cells during rotavirus infection in mice. *Virology* **337**: 210-221.
- Boucher RC (2004) New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Eur. Respir. J.* **23**: 146-158.
- Bowen WR, Lovitt RW & Wright CJ (2000) Direct quantification of *Aspergillus niger* spore adhesion to mica in air using an atomic force microscope. *Colloid. Surface. A* **173**: 205-210.
- Bowen WR, Lovitt RW & Wright CJ (2001) Atomic force microscopy study of the adhesion of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Colloid Interface Sci.* **237**: 54-61.
- Braat H, Rottiers P, Hommes DW, *et al.* (2006) A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **4**: 754-759.

- Brayshaw D, Berry M & McMaster T (2004) Reducing a polymer to its subunits as an aid to molecular mapping. *Nanotechnology* **15**: 1391–1396.
- Brooks SB & Tozeren A (1996) Flow past an array of cells that are adherent to the bottom plate of a flow channel. *Computers & Fluids* **25**: 741-757.
- Buck BL, Altermann E, Svingerud T & Klaenhammer TR (2005) Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 8344-8351.
- Bumbaca D, Littlejohn JE, Nayakanti H, Lucas AH, Rigden DJ, Galperin MY & Jedrzejewski MJ (2007) Genome-based identification and characterization of a putative mucin-binding protein from the surface of *Streptococcus pneumoniae*. *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.* **66**: 547-558.
- Busscher HJ & van Der Mei HC (1995) Use of flow chamber devices and image analysis methods to study microbial adhesion. *Methods in Enzymology*, Vol. 253 (Ron JD & Itzhak O, ed.), p. 455-477. Academic Press.
- Cao X, Bansil R, Bhaskar KR, Turner BS, LaMont JT, Niu N & Afdhal NH (1999) pH-dependent conformational change of gastric mucin leads to sol-gel transition. *Biophys. J.* **76**: 1250-1258.
- Challacombe SJ, Rahman D, Jeffery H, Davis SS & Ohagan DT (1992) Enhanced secretory IgA and systemic IgG antibody-responses after oral immunization with biodegradable microparticulates containing antigen. *Immunology* **76**: 164-168.
- Chapot-Chartier M-P, Vinogradov E, Sadovskaya I, *et al.* (2010) Cell surface of *Lactococcus lactis* is covered by a protective polysaccharide pellicle. *J. Biol. Chem.* **285**: 10464-10471.
- Comelli EM, Guggenheim B, Stingle F & Neeser J-R (2002) Selection of dairy bacterial strains as probiotics for oral health. *Eur. J. Oral Sci.* **110**: 218-224.
- Coyette J & Ghuysen JM (1970) Structure of the walls of *Lactobacillus acidophilus* strain 63 AM. *Biochemistry* **9**: 2935-2943.
- Cozens-Roberts C, Quinn JA & Lauffenberger DA (1990) Receptor-mediated adhesion phenomena. Model studies with the Radical-Flow Detachment Assay. *Biophys. J.* **58**: 107-125.
- Dabour N & LaPointe G (2005) Identification and molecular characterization of the chromosomal exopolysaccharide biosynthesis gene cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SMQ-461. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 7414-7425.
- Dague E, Delcorte A, Latge J-P & Dufrene YF (2008) Combined use of Atomic Force Microscopy, X-ray Photoelectron Spectroscopy, and Secondary Ion Mass Spectrometry for cell surface analysis. *Langmuir* **24**: 2955-2959.
- Dague E, Duval J, Jorand F, Thomas F & Gaboriaud F (2006) Probing surface structures of *Shewanella* spp. by microelectrophoresis. *Biophys. J.* **90**: 2612-2621.
- Dague E, Alsteens D, Latge J-P, Verbelen C, Raze D, Baulard AR & Dufrene YF (2007) Chemical force microscopy of single live cells. *Nano Lett.* **7**: 3026-3030.

- De Vuyst L & Leroy F (2007) Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *J. Mol. Microbiol. Biotech.* **13**: 194-199.
- Deacon MP, Davis SS, White RJ, *et al.* (1999) Are chitosan-mucin interactions specific to different regions of the stomach? Velocity ultracentrifugation offers a clue. *Carbohydr. Polym.* **38**: 235-238.
- Deacon MP, McGurk S, Roberts CJ, *et al.* (2000) Atomic force microscopy of gastric mucin and chitosan mucoadhesive systems. *Biochem. J.* **348**: 557-563.
- Deepika G, Green R, Frazier R & Charalampopoulos D (2009) Effect of growth time on the surface and adhesion properties of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *J. Appl. Microbiol.* **107**: 1230-1240.
- Dekker J, Rossen JWA, Büller HA & Einerhand AWC (2002) The MUC family: an obituary. *Trend. Biochem. Sci.* **27**: 126-131.
- Delcour J, Thierry F, Marie D, Emmanuelle P & Hols P (1999) The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria *Antonie van Leeuwenhoek* **76**: 159-184.
- Denou E, Pridmore RD, Berger B, Panoff J-M, Arigoni F & Brussow H (2008) Identification of genes associated with the long-gut-persistence phenotype of the probiotic *Lactobacillus johnsonii* Strain NCC533 using a combination of genomics and transcriptome analysis. *J. Bacteriol.* **190**: 3161-3168.
- Derjaguin BV & Landau L (1941) Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Acta Phys. Chim. URSS* **14**: 633-662.
- Deshpande G, Rao S & Patole S (2011) Progress in the field of probiotics: year 2011. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **27**: 13-18
- Dieye Y, Oxaran V, Ledue-Clier F, *et al.* (2010) Functionality of sortase A in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 7332-7337.
- Ding AM, Palmer RJ, Jr., Cisar JO & Kolenbrander PE (2010) Shear-enhanced oral microbial adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 1294-1297.
- Dufrêne YF (2002) Atomic force microscopy, a powerful tool in microbiology. *J. Bacteriol.* **184**: 5205-5213.
- Dufrêne YF (2008) Atomic force microscopy and chemical force microscopy of microbial cells. *Nat. Protocols* **3**: 1132-1138.
- Dufrêne YF, van der Wal A, Norde W & Rouxhet PG (1997) X-ray photoelectron spectroscopy analysis of whole cells and isolated cell walls of gram-positive bacteria: comparison with biochemical analysis. *J. Bacteriol.* **179**: 1023-1028.
- Dupres V, Menozzi FD, Loch C, *et al.* (2005) Nanoscale mapping and functional analysis of individual adhesins on living bacteria. *Nat. Meth.* **2**: 515-520.

- Dybwad GL (1985) A sensitive new method for the determination of adhesive bonding between a particle and a substrate. *J. Appl. Phys.* **58**: 2789-2790.
- Elliott JA, Collins MD, Pigott NE & Facklam RR (1991) Differentiation of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* from humans by comparison of whole-cell protein patterns. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 2731-2734.
- Elsom J, Lethem MI, Rees GD & Hunter AC (2008) Novel quartz crystal microbalance based biosensor for detection of oral epithelial cell-microparticle interaction in real-time. *Biosens. Bioelectron.* **23**: 1259-1265.
- Evans E & Ritchie K (1997) Dynamic strength of molecular adhesion bonds. *Biophys. J.* **72**: 1541-1555.
- Fatoyinbo HO, Hoettges KF, Reddy SM & Hughes MP (2007) An integrated dielectrophoretic quartz crystal microbalance (DEP-QCM) device for rapid biosensing applications. *Biosens. Bioelectron.* **23**: 225-232.
- Fawcett NC, Evans JA, Chen LC, Drozda KA & Flowers N (1988) A quartz crystal detector for DNA. *Anal. Lett.* **21**: 1099-1110.
- Fiebrig I, Harding SE, Rowe AJ, Hyman SC & Davis SS (1995) Transmission electron microscopy studies on pig gastric mucin and its interactions with chitosan. *Carbohydr. Polym.* **28**: 239-244.
- Finlay BB & Falkow S (1997) Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 136-169.
- Florin EL, Moy VT & Gaub HE (1994) Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs. *Science* **264**: 415-417.
- Forsén R, Niskasaari K & Niemitalo S (1985) Immunochemical demonstration of lipoteichoic acid as a surface-exposed plasma membrane antigen of slime-forming, encapsulated *Streptococcus cremoris* from the fermented milk product 'vili'. *FEMS Microbiol. Lett.* **26**: 249-253.
- Francius G, Lebeer S, Alsteens D, *et al.* (2008) Detection, localization, and conformational analysis of single polysaccharide molecules on live bacteria. *ACS Nano* **2**: 1921-1929.
- Gaboriaud F & Dufrière YF (2007) Atomic force microscopy of microbial cells: Application to nanomechanical properties, surface forces and molecular recognition forces. *Colloid. Surface. B* **54**: 10-19.
- Gallardo-Moreno AM, van der Mei HC, Busscher HJ, González-Martín ML, Bruque JM & Pérez-Giraldo C (2001) Adhesion of *Enterococcus faecalis* 1131 grown under subinhibitory concentrations of ampicillin and vancomycin to a hydrophilic and a hydrophobic substratum. *FEMS Microbiol. Lett.* **203**: 75-79.
- Gao Y, Lu Y, Teng K-L, Chen M-L, Zheng H-J, Zhu Y-Q & Zhong J (2011) Complete genome sequence of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CV56, a probiotic strain isolated from the vaginas of healthy women. *J. Bacteriol.* **193**: 2886-2887.

- Genta I, Costantini M, Asti A, Conti B & Montanari L (1998) Influence of glutaraldehyde on drug release and mucoadhesive properties of chitosan microspheres. *Carbohydr. Polym.* **36**: 81-88.
- Giaouris E, Chapot-Chartier M-P & Briandet R (2009) Surface physicochemical analysis of natural *Lactococcus lactis* strains reveals the existence of hydrophobic and low charged strains with altered adhesive properties. *Inter. J. Food Microbiol.* **131**: 2-9.
- Giaouris E, Briandet R, Meyrand M, Courtin P & Chapot-Chartier M-P (2008) Variations in the degree of D-Alanylation of Teichoic Acids in *Lactococcus lactis* alter resistance to cationic antimicrobials but have no effect on bacterial surface hydrophobicity and charge. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 4764-4767.
- Goldin BR & Gorbach SL (2008) Clinical indications for probiotics: an overview. *Clin. Infect. Dis.* **46**: S96-S100.
- Gopal PK & Crow VL (1993) Characterization of loosely associated material from the cell surface of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* E8 and its phage-resistant variant strain 398. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3177-3182.
- Grahn E, Holm SE, Lilja H & Sellgren K (1994) Interference of a *Lactococcus lactis* strain on the human gut flora and its capacity to pass the stomach and intestine. *Scand. J. Nutr.* **38**: 2-4.
- Granato D, Bergonzelli GE, Pridmore RD, Marvin L, Rouvet M & Corthesy-Theulaz IE (2004) Cell surface-associated elongation factor Tu mediates the attachment of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucins. *Infect. Immun.* **72**: 2160-2169.
- Granato D, Perotti F, Masserey I, Rouvet M, Golliard M, Servin A & Brassart D (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**: 1071-1077.
- Grandbois M, Beyer M, Rief M, Clausen-Schaumann H & Gaub HE (1999) How strong is a covalent bond? *Science* **283**: 1727-1730.
- Grimoud J (2010) Probiotiques, prébiotiques, synbiotiques et prévention des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin : proposition d'un crible de sélection *in vitro*. Thesis, Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, Toulouse.
- Guillemot G (2006) Compréhension des mécanismes à l'origine de l'adhésion de *Saccharomyces cerevisiae* sur acier inoxydable. Thesis, Institut National des Sciences Appliquées, Toulouse.
- Guillemot G, Lorthois S, Schmitz P & Mercier-Bonin M (2007) Evaluating the adhesion force between *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells and polystyrene from shear-flow induced detachment experiments. *Chem.Eng. Res. Design* **85**: 800-807.
- Guillemot G, Vaca-Medina G, Martin-Yken H, Vernhet A, Schmitz P & Mercier-Bonin M (2006) Shear-flow induced detachment of *Saccharomyces cerevisiae* from stainless steel: Influence of yeast and solid surface properties. *Colloid. Surface. B* **49**: 126-135.

- Habimana O, Le Goff C, Juillard V, Bellon-Fontaine M-N, Buist G, Kulakauskas S & Briandet R (2007) Positive role of cell wall anchored proteinase PrtP in adhesion of lactococci. *BMC Microbiology* **7**: 36-43.
- Hagi T & Hoshino T (2009) Screening and characterization of potential probiotic lactic acid bacteria from cultured common carp intestine. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**: 1479-1483.
- Hancock IC & Poxton IR (1988) Structure of bacteria and their envelope. *Bacterial Cell Surface Techniques*, p. 1-32. John Wiley & Sons, New York, USA.
- Hanniffy S, Wiedermann U, Repa A, *et al.* (2004) Potential and opportunities for use of recombinant lactic acid bacteria in human health. *Advances in Applied Microbiology*, Vol.56, p. 1-64. Academic Press.
- Harding S (1989) The macrostructure of mucus glycoproteins in solution. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Vol. 47, p. 345-381. Academic Press.
- Harding S, Davis S, Deacon M & Fiebrig I (1999) Biopolymer mucoadhesives. *Biotechnology & genetic engineering reviews* **16**: 41-86.
- Hasnain SZ, Wang H, Ghia JE, *et al.* (2010) Mucin gene deficiency in mice impairs host resistance to an enteric parasitic infection. *Gastroenterology* **138**: 1763-1771.
- Hattrup CL & Gendler SJ (2008) Structure and function of the cell surface (tethered) mucins. *Ann. Rev. Physiol.* **70**: 431-457.
- Heinemann C, van Hylekama Vlieg JE, Janssen DB, Busscher HJ, van der Mei HC & Reid G (2000) Purification and characterization of a surface-binding protein from *Lactobacillus fermentum* RC-14 that inhibits adhesion of *Enterococcus faecalis* 1131. *FEMS Microbiol. Lett.* **190**: 177-180.
- Heinz WF & Hoh JH (1999) Spatially resolved force spectroscopy of biological surfaces using the atomic force microscope. *Trend. Biotechnol.* **17**: 143-150.
- Henrissat B, Surolia A & Stanley P (2009) Essentials of Glycobiology. *2nd edn* (Varki, A. *et al.*,ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Hilgendorf C, Spahn-Langguth H, Regårdh CG, Lipka E, Amidon GL & Langguth P (2000) Caco-2 versus caco-2/HT29-MTX co-cultured cell lines: Permeabilities via diffusion, inside- and outside-directed carrier-mediated transport. *J. Pharma. Sci.* **89**: 63-75.
- Hinterdorfer P, Baumgartner W, Gruber HJ, Schilcher K & Schindler H (1996) Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**: 3477-3481.
- Hollingsworth MA & Swanson BJ (2004) Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat. Rev. Cancer* **4**: 45-60.
- Holmén Larsson JM, Karlsson H, Sjövall H & Hansson GC (2009) A complex, but uniform O-glycosylation of the human MUC2 mucin from colonic biopsies analyzed by nanoLC/MSn. *Glycobiology* **19**: 756-766.

- Hong Z, Chasan B, Bansil R, Turner BS, Bhaskar KR & Afdhal NH (2005) Atomic force microscopy reveals aggregation of gastric mucin at low pH. *Biomacromolecules* **6**: 3458-3466.
- Höök F, Kasemo B, Nylander T, Fant C, Sott K & Elwing H (2001) Variations in coupled water, viscoelastic properties, and film thickness of a Mefp-1 protein film during adsorption and cross-linking: a quartz crystal microbalance with dissipation monitoring, ellipsometry, and surface plasmon resonance study. *Anal. Chem.* **73**: 5796-5804.
- Hughenoltz J, Sybesma W, Nierop Groot M, *et al.* (2002) Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of nutraceuticals. *Antonie van Leeuwenhoek* **82**: 217-235.
- Iñiguez-Palomares C, Jiménez-Flores R, Vázquez-Moreno L, Ramos-Clamont-Montfort G & Acedo-Félix E (2011) Protein-carbohydrate interactions between *Lactobacillus salivarius* and pig mucins. *J. Animal Sci.* **89**: [Epub ahead of print]
- Irwin EF, Ho JE, Kane SR & Healy KE (2005) Analysis of interpenetrating polymer networks via quartz crystal microbalance with dissipation monitoring. *Langmuir* **21**: 5529-5536.
- Iwaki M, Okahashi N, Takahashi I, Kanamoto T, Sugita-Konishi Y, Aibara K & Koga T (1990) Oral immunization with recombinant *Streptococcus lactis* carrying the *Streptococcus mutans* surface protein antigen gene. *Infect. Immun.* **58**: 2929-2934.
- Izquierdo E, Horvatovich P, Marchioni E, Aoude-Werner D, Sanz Y & Ennahar S (2009) 2-DE and MS analysis of key proteins in the adhesion of *Lactobacillus plantarum*, a first step toward early selection of probiotics based on bacterial biomarkers. *Electrophoresis* **30**: 949-956.
- Jain M, Karan D, Batra S & Varshney G (2001) Mucins in protozoan parasites. *Front. Biosci.* **6**: D1276-1283.
- James AM (1991) Charge properties of microbial cell surfaces. *Microbial cell surface analysis: structural and physicochemical methods*, (N. Mozes PSH, H. J. Busscher, and P. G. Rouxhet, ed.), p. 221-262. VCH Publishers, New York.
- Johansson MEV, Phillipson M, Petersson J, Velcich A, Holm L & Hansson GC (2008) The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**: 15064-15069.
- Johnson-Henry KC, Hagen KE, Gordonpour M, Tompkins TA & Sherman PM (2007) Surface-layer protein extracts from *Lactobacillus helveticus* inhibit enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adhesion to epithelial cells. *Cell. Microbiol.* **9**: 356-367.
- Johnson KG & McDonald IJ (1974) Peptidoglycan structure in cell walls of parental and filamentous *Streptococcus cremoris* HP. *Canad. J. Microbiol.* **20**: 905-913.
- Kankainen M, Paulin L, Tynkkynen S, *et al.* (2009) Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human- mucus binding protein. *Proc. Natl Acad. Sci.* **106**: 17193-17198.

- Karlsson NG, Nordman H, Karlsson H, Carlstedt I & Hansson GC (1997) Glycosylation differences between pig gastric mucin populations: a comparative study of the neutral oligosaccharides using mass spectrometry. *Biochem. J.* **326**: 911-917.
- Khanvilkar K, Donovan MD & Flanagan DR (2001) Drug transfer through mucus. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **48**: 173-193.
- Kimoto H, Mizumachi K, Okamoto T & Kurisaki J (2004) New Lactococcus strain with immunomodulatory activity: Enhancement of Th1-type immune response. *Microbiology And Immunology* **48**: 75-82.
- Kimoto H, Kurisaki J, Tsuji NM, Ohmomo S & Okamoto T (1999) Lactococci as probiotic strains: adhesion to human enterocyte-like Caco-2 cells and tolerance to low pH and bile. *Lett. Appl. Microbiol.* **29**: 313-316.
- Klijn N, Weerkamp A & de Vos W (1995) Genetic marking of Lactococcus lactis shows its survival in the human gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2771-2774.
- Kojima N, Araki Y & Ito E (1986) Biosynthesis of the wall acidic polysaccharide in *Bacillus cereus* AHU 1356. *Eur. J. Biochem.* **155**: 513-519.
- Kok J, Buist G, Zomer AL, van Hijum SAFT & Kuipers OP (2005) Comparative and functional genomics of lactococci. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**: 411-433.
- Kos B, Šušković J, Vuković S, Šimpraga M, Frece J & Matošić S (2003) Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J. Appl. Microbiol.* **94**: 981-987.
- Krishnan GP & Leighton DT (1995) Inertial lift on a moving sphere in contact with a plane wall in a shear flow *Physic. Fluid.* **7**: 2538-2545.
- Kunji ERS, Chan KW, Slotboom DJ, Floyd S, O'Connor R & Monné M (2005) Eukaryotic membrane protein overproduction in *Lactococcus lactis*. *Curr. Opin. Biotech.* **16**: 546-551.
- Kuo SC & Lauffenburger DA (1993) Relationship between receptor/ligand binding affinity and adhesion strength. *Biophys. J.* **65**: 2191-2200.
- Kwon S, Yoo I-K, Lee WG, Chang HN & Chang YK (2001) High-rate continuous production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* in a two-stage membrane cell-recycle bioreactor. *Biotech. Bioeng.* **73**: 25-34.
- Lai SK, Wang Y-Y, Cone R, Wirtz D & Hanes J (2009) Altering mucus rheology to "solidify" human mucus at the nanoscale. *PLoS ONE* **4**: e4294.
- Lai SK, O'Hanlon DE, Harrold S, Man ST, Wang Y-Y, Cone R & Hanes J (2007) Rapid transport of large polymeric nanoparticles in fresh undiluted human mucus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 1482-1487.
- Landa AS, Van Der Mei HC & Busscher HJ (1997) Detachment of linking film bacteria from enamel surfaces by oral rinses and penetration of sodium lauryl sulphate through an artificial oral biofilm. *Adv. Dental Res.* **11**: 528-538.

- Landa AS, De Belt-Gritter Bv, Der Mei HCv & Busscher HJ (1999) Recalcitrance of *Streptococcus mutans* biofilms towards detergent-stimulated detachment. *Eur. J.Oral Sci.* **107**: 236-243.
- Lang HP, Hegner M, Meyer E & Gerber C (2002) Nanomechanics from atomic resolution to molecular recognition based on atomic force microscopy technology. *Nanotechnology* **13**: R29-R36.
- Lebeer S, Vanderleyden J & De Keersmaecker SCJ (2008) Genes and molecules of Lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**: 728-764.
- Lee GU, Chrisey LA & Colton RJ (1994) Direct measurement of the forces between complementary strands of DNA. *Science* **266**: 771-773.
- Lee GU, Kidwell DA & Colton RJ (2002) Sensing discrete streptavidin-biotin interactions with atomic force microscopy. *Langmuir* **10**: 354-357.
- Lee S, Muller M, Rezwani K & Spencer ND (2005) Porcine Gastric Mucin (PGM) at the water/poly(dimethylsiloxane) (PDMS) interface: influence of pH and ionic strength on its conformation, adsorption, and aqueous lubrication properties. *Langmuir* **21**: 8344-8353.
- Leeuw Ed, Li X & Lu W (2006) Binding characteristics of the *Lactobacillus brevis* ATCC 8287 surface layer to extracellular matrix proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* **260**: 210-215.
- Lehr C-M (2000) Lectin-mediated drug delivery: The second generation of bioadhesives. *J. Control. Release* **65**: 19-29.
- Leitner VM, Walker GF & Bernkop-Schnürch A (2003) Thiolated polymers: evidence for the formation of disulphide bonds with mucus glycoproteins. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **56**: 207.
- Lesuffleur T, Barbat A, Dussaulx E & Zweibaum A (1990) Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells. *Cancer Res* **50**: 6334-6343.
- Lindén SK, Florin THJ & McGuckin MA (2008) Mucin dynamics in intestinal bacterial infection. *PLoS ONE* **3**: e3952.
- Lindén SK, Sheng YH, Every AL, *et al.* (2009) MUC1 limits *Helicobacter pylori* infection both by steric hindrance and by acting as a releasable decoy. *PLoS Pathog* **5**: e1000617.
- Lindgren SE, Swaisgood HE, Janolino VG, Axelsson LT, Richter CS, Mackenzie JM & Dobrogosz WJ (1992) Binding of *Lactobacillus reuteri* to fibronectin immobilized on glass beads. *Zentralbl Bakteriol* **277**: 519-528.
- Lorca G, Torino MaI, Font de Valdez G & Ljungh Å (2002) Lactobacilli express cell surface proteins which mediate binding of immobilized collagen and fibronectin. *FEMS Microbiology Letters* **206**: 31-37.
- Lorthois S, Schmitz P & Anglés-Cano E (2001) Experimental study of fibrin/fibrin-specific molecular interactions using a sphere/plane adhesion model. *J. Colloid Interface Sci.* **241**: 52-62.

- MacAdam A (1993) The effects of gastro-intestinal mucus on drug adsorption. *Adv. drug deliv. rev.* **11**: 201-220.
- Mack DR & Sherman PM (1999) Hydrophobicity and the gastrointestinal tract: methods of determination, its source and implications for bacterial adherence. *Colloid. Surface. B* **15**: 355-363.
- Mack DR, Michail S, Wei S, McDougall L & Hollingsworth MA (1999) Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence *in vitro* by inducing intestinal mucin gene expression. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **276**: G941-G950.
- Mack DR, Ahrne S, Hyde L, Wei S & Hollingsworth MA (2003) Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells *in vitro*. *Gut* **52**: 827-833.
- Mahdavi J, Sondén B, Hurtig M, *et al.* (2002) *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science* **297**: 573-578.
- Malmsten M, Blomberg E, Claesson P, Carlstedt I & Ljusegren I (1992) Mucin layers on hydrophobic surfaces studied with ellipsometry and surface force measurements. *J. Colloid Interface Sci.* **151**: 579-590.
- Mandlik A, Swierczynski A, Das A & Ton-That H (2008) Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development. *Trend. Microbiol.* **16**: 33-40.
- Mannam P, Jones KF & Geller BL (2004) Mucosal vaccine made from live, recombinant *Lactococcus lactis* protects mice against pharyngeal infection with *Streptococcus pyogenes*. *Infect. Immun.* **72**: 3444-3450.
- Maria Carmen Collado, Erika Isolauri, Seppo Salminen & Yolanda Sanz (2009) The impact of probiotic on gut health. *Current Drug Metabolism* **10**: 68-78.
- MarketsandMarkets (2009) Probiotic Market- Advanced Technologies and Global Market (2009 - 2014), Dallas, Texas.
- Marx KA, Zhou T, Montrone A, McIntosh D & Braunhut SJ (2005) Quartz crystal microbalance biosensor study of endothelial cells and their extracellular matrix following cell removal: Evidence for transient cellular stress and viscoelastic changes during detachment and the elastic behavior of the pure matrix. *Anal. Biochem.* **343**: 23-34.
- McGuckin MA, Lindén SK, Sutton P & Florin TH (2011) Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nat. Rev. Micro.* **9**: 265-277.
- McMaster T, Berry M, Corfield A & Miles M (1999) Atomic force microscopy of the submolecular architecture of hydrated ocular mucins. *Biophys. J.* **77**: 533-541.
- Mercier-Bonin M, Dehouche A, Morchain J & Schmitz P (2011) Orientation and detachment dynamics of *Bacillus* spores from stainless steel under controlled shear flow: Modelling of the adhesion force. *Inter. J. Food Microbiol.* **146**: 182-191.

- Mercier-Bonin M, Adoue M, Zanna S, Marcus P, Combes D & Schmitz P (2009) Evaluation of adhesion force between functionalized microbeads and protein-coated stainless steel using shear-flow-induced detachment. *J. Colloid Interface Sci.* **338**: 73-81.
- Meurman JH & Stamatova I (2007) Probiotics: contributions to oral health. *Oral Diseases* **13**: 443-451.
- Michael de Vrese & Schrezenmeir J (2008) Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics *Food Biotechnology*, Vol. 111, p. 1-66. Springer Berlin.
- Michelle D, Eric K, Denis W & Justin H (2004) Transport of polymeric nanoparticle gene carriers in gastric mucus. *Biotechnology Progress* **20**: 851-857.
- Mierau I & Kleerebezem M (2005) 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotech.* **68**: 705-717.
- Mills S, McAuliffe OE, Coffey A, Fitzgerald GF & Ross RP (2006) Plasmids of lactococci – genetic accessories or genetic necessities? *FEMS Microbiol. Rev.* **30**: 243-273.
- Millsap KW, Bos R, Van Der Mei HC & Busscher HJ (2000) Dot assay for determining adhesive interactions between yeasts and bacteria under controlled hydrodynamic conditions. *J. Microbiol. Methods* **40**: 225-232.
- Miorner H, Johansson G & Kronvall G (1983) Lipoteichoic acid is the major cell wall component responsible for surface hydrophobicity of group A streptococci. *Infect. Immun.* **39**: 336-343.
- Miyoshi Y, Okada S, Uchimura T & Satoh E (2006) A mucus adhesion promoting protein, MapA, mediates the adhesion of *Lactobacillus reuteri* to Caco-2 human intestinal epithelial cells. *Biosci. Biotech. Biochem.* **70**: 1622-1628.
- Molino PJ, Hodson OM, Quinn JF & Wetherbee R (2008) The Quartz Crystal Microbalance: a new tool for the investigation of the bioadhesion of diatoms to surfaces of differing surface energies. *Langmuir* **24**: 6730-6737.
- Mozes N, Léonard A & Rouxhet PG (1988) On the relations between the elemental surface composition of yeasts and bacteria and their charge and hydrophobicity. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **945**: 324-334.
- Navarre WW & Schneewind O (1999) Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 174-229.
- Neutra M & Forstner J (1987) Gastrointestinal mucus: synthesis, secretion, and function. *Physiology of the gastrointestinal tract* (Johnson L, ed.), Chapter 34. Raven Press, New York.
- Neutra MR & Kozlowski PA (2006) Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat Rev Immunol* **6**: 148-158.
- Nilsson LM, Thomas WE, Trintchina E, Vogel V & Sokurenko EV (2006) Catch bond-mediated adhesion without a shear threshold. *J. Bio. Chem.* **281**: 16656-16663.

- Nomura M, Kobayashi M, Narita T, Kimoto-Nira H & Okamoto T (2006) Phenotypic and molecular characterization of *Lactococcus lactis* from milk and plants. *J. Appl. Microbiol.* **101**: 396-405.
- Nordman H, Borén T, Davies JR, Engstrand L & Carlstedt I (1999) pH-dependent binding of *Helicobacter pylori* to pig gastric mucins. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **24**: 175-181.
- Nordman H, Davies JR, Herrmann A, Karlsson NG, Hansson GC & Carlstedt I (1997) Mucus glycoproteins from pig gastric mucosa: identification of different mucin populations from the surface epithelium. *Biochem. J.* **326**: 903-910.
- Norton P, Le Page R & Wells J (1995) Progress in the development of *Lactococcus lactis* as a recombinant mucosal vaccine delivery system. *Folia Microbiologica* **40**: 225-230.
- Norton PM, Wells JM, Brown HWG, Macpherson AM & Le Page RWF (1997) Protection against tetanus toxin in mice nasally immunized with recombinant *Lactococcus lactis* expressing tetanus toxin fragment C. *Vaccine* **15**: 616-619.
- Nouaille S, Ribeiro LA, Miyoshi A, *et al.* (2003) Heterologous protein production and delivery systems for *Lactococcus lactis*. *Genet. Mol. Res.* **2**: 102-111.
- O'Neill ME (1968) A sphere in contact with a plane wall in a slow linear shear flow. *Chem. Eng. Sci.* **23**: 1293-1298.
- O'Sullivan CK & Guilbault GG (1999) Commercial quartz crystal microbalances - theory and applications. *Biosens. Bioelectron.* **14**: 663-670.
- Ohara S, Ishihara K & Hotta K (1993) Regional differences in pig gastric mucins. *Comp. Biochem. Physiol. B* **106**: 153-158.
- Olofsson A-C, Hermansson M & Elwing H (2005) Use of a quartz crystal microbalance to investigate the antiadhesive potential of N-acetyl-L-cysteine. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 2705-2712.
- Olsson ALJ, van der Mei HC, Busscher HJ & Sharma PK (2009) Influence of cell surface appendages on the bacterium-substratum interface measured real-time using QCM-D. *Langmuir* **25**: 1627-1632.
- Olsson ALJ, van der Mei HC, Busscher HJ & Sharma PK (2011) Acoustic sensing of the bacterium-substratum interface using QCM-D and the influence of extracellular polymeric substances. *J. Colloid Interface Sci.* **357**: 135-138.
- Otto K, Elwing H & Hermansson M (1999) Effect of ionic strength on initial interactions of *Escherichia coli* with surfaces, studied on-line by a novel quartz crystal microbalance technique. *J. Bacteriol.* **181**: 5210-5218.
- Otvos L & Cudic M (2003) Conformation of glycopeptides. *Mini Rev. Med. Chem.* **3**: 703-711.
- Ouwehand A, Tölkö S, Kulmala J, Salminen S & Salminen E (2000) Adhesion of inactivated probiotic strains to intestinal mucus. *Lett. Appl. Microbiol.* **31**: 82-86.

- Ouwehand AC, Kirjavainen PV, Grönlund MM, Isolauri E & Salminen SJ (1999) Adhesion of probiotic micro-organisms to intestinal mucus. *Inter. Dairy J.* **9**: 623-630.
- Parot P, Dufrêne YF, Hinterdorfer P, Grimellec CL, Navajas D, Pellequer J-L & Scheuring S (2007) Past, present and future of atomic force microscopy in life sciences and medicine. *J. Mol. Recog.* **20**: 418-431.
- Passerini D, Beltramo C, Coddeville M, Quentin Y, Ritzenthaler P, Daveran-Mingot M-L & Le Bourgeois P (2010) Genes but not genomes reveal bacterial domestication of *Lactococcus lactis*. *PLoS ONE* **5**: e15306.
- Perez-Vilar J & Hill RL (1999) The structure and assembly of secreted mucins. *J. Biol. Chem.* **274**: 31751-31754.
- Pinto M, Robineleon S, Appay M, *et al.* (1983) Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Bio. Cell* **47**: 323-330.
- Poitras C & Tufenkji N (2009) A QCM-D-based biosensor for *E. coli* O157:H7 highlighting the relevance of the dissipation slope as a transduction signal. *Biosens. Bioelectron.* **24**: 2137-2142.
- Pomorska A, Shchukin D, Hammond R, Cooper MA, Grundmeier G & Johannsmann D (2010) Positive frequency shifts observed upon adsorbing micron-sized solid objects to a quartz crystal microbalance from the liquid phase. *Anal. Chem.* **82**: 2237-2242.
- Ponchel G & Irache J-M (1998) Specific and non-specific bioadhesive particulate systems for oral delivery to the gastrointestinal tract. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **34**: 191-219.
- Pritchard GG & Coolbear T (1993) The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. *FEMS Microbio. Rev.* **12**: 179-206.
- R. Fuller A (1989) Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Microbiology* **66**: 365-378.
- Rademaker JLW, Herbet H, Starrenburg MJC, *et al.* (2007) Diversity analysis of dairy and nondairy *Lactococcus lactis* isolates, using a novel multilocus sequence analysis scheme and (GTG)₅-PCR fingerprinting. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 7128-7137.
- Ren Y & Somasundaran P (1993) *Oral mucosal drug delivery*. Marcel Dekker Inc.
- Robinson K, Chamberlain LM, Schofield KM, Wells JM & LePage RWF (1997) Oral vaccination of mice against tetanus with recombinant *Lactococcus lactis*. *Nat. Biotech.* **15**: 653-657.
- Robinson K, Chamberlain LM, Lopez MC, Rush CM, Marcotte H, Le Page RWF & Wells JM (2004) Mucosal and cellular immune responses elicited by recombinant *Lactococcus lactis* strains expressing tetanus toxin fragment C. *Infect. Immun.* **72**: 2753-2761.
- Rogunova M, Blackwell J, Jamieson A, Pasumar-Thy M & Gerken T (1997) Effects of lipids on the structure and rheology of gels formed by canine submaxillary mucin. *Biorheology* **34**: 295– 308.

- Roissart IH & Luguet FM (1994) *Bactéries lactiques : aspects fondamentaux et technologiques*. Grenoble , France.
- Roos S & Jonsson H (2002) A high-molecular-mass cell-surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components. *Microbiology* **148**: 433-442.
- Rosenberg. M & Kjelleberg. S (1986) Hydrophobic interactions: role in bacterial adhesion. *Microbiol. Ecol.* **9**: 353-393.
- Round AN, Berry M, McMaster TJ, Stoll S, Gowers D, Corfield AP & Miles MJ (2002) Heterogeneity and persistence length in human ocular mucins. *Biophys. J.* **83**: 1661-1670.
- Rousset M (1986) The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two *in vitro* models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie* **68**: 1035-1040.
- Ruas-Madiedo P, Gueimonde M, Margolles A, de los Losreyes-Gavilán CG & Salminen S (2006) Exopolysaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to human intestinal mucus. *J. Food Protect.* **69**: 2011-2015.
- Sarem-Damerdjil LO, Sarem F, Marchal L & Nicolas J-P (1995) *In vitro* colonization ability of human colon mucosa by exogenous *Lactobacillus* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **131**: 133-137.
- Sauerbrey G (1959) The use of a quartz crystal oscillator for weighing thin layers and microweighing applications. *Z. Phys.* **155**: 206-222.
- Schär-Zammaretti P & Ubbink J (2003) The cell wall of lactic acid bacteria: surface constituents and macromolecular conformations. *Biophys. J.* **85**: 4076-4092.
- Scharfman A, Lamblin G & Roussel P (1995) Interactions between human respiratory mucins and pathogens. *Biochem. Soc. Trans.* **23**: 836-839.
- Schlee M, Wehkamp J, Altenhoefer A, Oelschlaeger TA, Stange EF & Fellermann K (2007) Induction of human β -defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin. *Infect. Immun.* **75**: 2399-2407.
- Schlee M, Harder J, Köten B, Stange EF, Wehkamp J & Fellermann K (2008) Probiotic lactobacilli and VSL#3 induce enterocyte β -defensin 2. *Clin. Exper. Immun.* **151**: 528-535.
- Schleifer KH & Kandler O (1972) Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Microbio. Mol. Bio. Rev.* **36**: 407-477.
- Schleifer KH & Kilpper-Bälz R (1987) Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci: a review. *System. Appl. Microbiol.* **10**: 1-19.
- Schleifer KH, Kraus J, Dvorak C, Kilpper-Bälz R, Collins MD & Fischer W (1985) Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* **6**: 183-195.

- Schlundt J, Saadbye P, Lohmann B, Jacobsen BL & Nielsen EM (1994) Conjugal transfer of plasmid DNA between *Lactococcus lactis* strains and distribution of transconjugants in the digestive tract of gnotobiotic rats. *Micro.Ecol. Health Dis.* **7**: 59-69.
- Schofield AL, Rudd TR, Martin DS, Fernig DG & Edwards C (2007) Real-time monitoring of the development and stability of biofilms of *Streptococcus mutans* using the quartz crystal microbalance with dissipation monitoring. *Biosens. Bioelectron.* **23**: 407-413.
- Servin AL (2004) Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**: 405-440.
- Seth A, Yan F, Polk DB & Rao RK (2008) Probiotics ameliorate the hydrogen peroxide-induced epithelial barrier disruption by a PKC- and MAP kinase-dependent mechanism. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **294**: G1060-G1069.
- Sheehan JK, Kirkham S, Howard M, *et al.* (2004) Identification of molecular intermediates in the assembly pathway of the MUC5AC mucin. *J. Biol. Chem.* **279**: 15698-15705.
- Shi L & Caldwell KD (2000) Mucin adsorption to hydrophobic surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* **224**: 372-381.
- Shons A, Dorman F & Najarian J (1972) The piezoelectric quartz immunosensor. *J. Biomed. Mater. Res.* **6**: 565-570.
- Siezen RJ (1999) Multi-domain, cell-envelope proteinases of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **76**: 139-155.
- Siezen RJ, Starrenburg MJC, Boekhorst J, Renckens B, Molenaar D & van Hylckama Vlieg JET (2007) Genome-scale genotype-phenotype matching of two *Lactococcus lactis* plant isolates identifies adaptation mechanisms to the plant niche. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 424-436.
- Sijtsma L, Wouters JT & Hellingwerf KJ (1990) Isolation and characterization of lipoteichoic acid, a cell envelope component involved in preventing phage adsorption, from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK110. *J. Bacteriol.* **172**: 7126-7130.
- Sijtsma L, Hellingwerf. K. J. & Wouters JTM (1991) Composition and phage binding capacity of cell walls isolated from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK 110 and SK112. *Neth. Milk Dairy J.* **45**: 81-95.
- Sillanpaa J, Martinez B, Antikainen J, *et al.* (2000) Characterization of the collagen-binding S-Layer protein CbsA of *Lactobacillus crispatus*. *J. Bacteriol.* **182**: 6440-6450.
- Slomiany BL & Slomiany A (1991) Role of mucus in gastric mucosal protection. *J. Physiol. Pharmacol.* **42**: 147-161.
- Smit G, Smit BA & Engels WJM (2005) Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**: 591-610.
- Smits HH, Engering A, van der Kleij D, *et al.* (2005) Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells *in vitro* by modulating dendritic cell function through

- dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. *J. Allergy Clin. Immun.* **115**: 1260-1267.
- Steidler L & Rottiers P (2006) Therapeutic drug delivery by genetically modified *Lactococcus lactis*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1072**: 176-186.
- Steidler L, Rottiers P & Coulie B (2009) Actobiotics™ as a novel method for cytokine delivery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1182**: 135-145.
- Steidler L, Hans W, Schotte L, *et al.* (2000) Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* **289**: 1352-1355.
- Stephanopoulos G (1994) Metabolic engineering. *Curr. Opin. Biotech.* **5**: 196-200.
- Stiles ME (1996) Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **70**: 331-345.
- Strous GJ & Dekker J (1992) Mucin-type glycoproteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol.* **27**: 57 - 92.
- Sugimura Y, Hagi T & Hoshino T (2011) Correlation between *in vitro* mucus adhesion and the *in vivo* colonization ability of lactic acid bacteria: screening of new candidate carp probiotics. *Biosci. Biotech. Biochem.* **75**: 511-515.
- Sutcliffe IC & Shaw N (1991) Atypical lipoteichoic acids of gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* **173**: 7065-7069.
- Tailliez P (2001) Mini-revue : les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il y a près de 3 milliards d'années. *Lait* **81**: 1-11.
- Tannock GW, Munro K, Harmsen HJM, Welling GW, Smart J & Gopal PK (2000) Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2578-2588.
- Tanous C, Chambellon E, Le Bars D, Delespaul G & Yvon M (2006) Glutamate dehydrogenase activity can be transmitted naturally to *Lactococcus lactis* strains to stimulate amino acid conversion to aroma compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 1402-1409.
- Taranto MP, Vera JL, Hugenholtz J, De Valdez GF & Sesma F (2003) *Lactobacillus reuteri* CRL1098 Produces Cobalamin. *J. Bacteriol.* **185**: 5643-5647.
- Thomas WE, Trintchina E, Forero M, Vogel V & Sokurenko EV (2002) Bacterial adhesion to target cells enhanced by shear force. *Cell* **109**: 913-923.
- Thomas WE, Nilsson LM, Forero M, Sokurenko EV & Vogel V (2004) Shear-dependent 'stick-and-roll' adhesion of type 1 fimbriated *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **53**: 1545-1557.
- Thornton DJ, Rousseau K & McGuckin MA (2008) Structure and function of the polymeric mucins in airways mucus. *Ann. Rev. Physiol.* **70**: 459-486.

Thorslund S, Larsson R, Nikolajeff F, Bergquist J & Sanchez J (2007) Bioactivated PDMS microchannel evaluated as sensor for human CD4+ cells--The concept of a point-of-care method for HIV monitoring. *Sens. Actuators, B* **123**: 847-855.

Todorov SD, Botes M, Danova ST & Dicks LMT (2007) Probiotic properties of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* HV219, isolated from human vaginal secretions. *J. Appl. Microbiol.* **103**: 629-639.

Tolker-Nielsen T & Sternberg C (2005) Growing and analyzing biofilms in flow chambers. *Current Protocols in Microbiology*, John Wiley & Sons, Inc.

Touhami A, Jericho MH, Boyd JM & Beveridge TJ (2006) Nanoscale characterization and determination of adhesion forces of *Pseudomonas aeruginosa* pili by using atomic force microscopy. *J. Bacteriol.* **188**: 370-377.

Tuomola E, Crittenden R, Playne M, Isolauri E & Salminen S (2001) Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *Am J Clin Nutr* **73**: 393S-398.

Urbach G (1995) Contribution of lactic acid bacteria to flavour compound formation in dairy products. *Inter. Dairy J.* **5**: 877-903.

Valeur N, Engel P, Carbajal N, Connolly E & Ladefoged K (2004) Colonization and immunomodulation by *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 in the human gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 1176-1181.

Van der Sluis M, De Koning BAE, De Bruijn ACJM, *et al.* (2006) Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology* **131**: 117-129.

Van Hylckama Vlieg JET, Rademaker JLW, Bachmann H, Molenaar D, Kelly WJ & Siezen RJ (2006) Natural diversity and adaptive responses of *Lactococcus lactis*. *Curr. Opin. Biotech.* **17**: 183-190.

van Kranenburg R, van Swam II, Marugg JD, Kleerebezem M & de Vos WM (1999) Exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis* NIZO B40: functional analysis of the glycosyltransferase genes involved in synthesis of the polysaccharide backbone. *J. Bacteriol.* **181**: 338-340.

Van Oss CJ, Good RJ & Chaudhury MK (1986) The role of van der Waals forces and hydrogen bonds in "hydrophobic interactions" between biopolymers and low energy surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* **111**: 378-390.

van Pijkeren J-P, Canchaya C, Ryan KA, *et al.* (2006) Comparative and functional analysis of sortase-dependent proteins in the predicted secretome of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 4143-4153.

Veigel C & Schmidt CF (2011) Moving into the cell: single-molecule studies of molecular motors in complex environments. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**: 163-176.

Velegol SB & Logan BE (2002) Contributions of bacterial surface polymers, electrostatics, and cell elasticity to the shape of AFM force curves. *Langmuir* **18**: 5256-5262.

- Vélez MP, De Keersmaecker CJS & Vanderleyden J (2007) Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract. *FEMS Microbiol. Lett.* **276**: 140-148.
- Verwey EJW & Overbeek JTG (1948) *Theory of the stability of lyophobic colloids*. Elsevier Publishing Company Inc.
- Vesterlund S, Paltta J, Karp M & Ouwehand AC (2005) Adhesion of bacteria to resected human colonic tissue: quantitative analysis of bacterial adhesion and viability. *Res Microbiol* **156**: 238-244.
- Voinova MV, Jonson M & Kasemo B (2002) "Missing mass" effect in biosensor's QCM applications. *Biosens. Bioelectron.* **17**: 835-841.
- von Kleist S, Chany E, Burtin P, King M & Fogh J (1975) Immunohistology of the antigenic pattern of a continuous cell line from a human colon tumor. *J. Natl. Cancer Inst.* **55**: 555-560.
- von Ossowski I, Reunanen J, Satokari R, *et al.* (2010) Mucosal adhesion properties of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG SpaCBA and SpaFED pilin subunits. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 2049-2057.
- Walter J, Schwab C, Loach DM, Ganzle MG & Tannock GW (2008) Glucosyltransferase A (GtfA) and inulosucrase (Inu) of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 contribute to cell aggregation, *in vitro* biofilm formation, and colonization of the mouse gastrointestinal tract. *Microbiology* **154**: 72-80.
- Walter J, Loach DM, Alqumber M, Rockel C, Hermann C, Pfitzenmaier M & Tannock GW (2007) d-Alanyl ester depletion of teichoic acids in *Lactobacillus reuteri* 100-23 results in impaired colonization of the mouse gastrointestinal tract. *Environ. Microbiol.* **9**: 1750-1760.
- Walter. J (2005) The microecology of lactobacilli in the gastrointestinal tract. *Probiotics and Prebiotics: Scientific Aspects*, p. 51-82. Caister Academic Press, Dunedin, New Zealand.
- Wataoka I, Urakawa H, Kobayashi K, Akaike T, Schmidt M & Kajiwara K (1999) Structural characterization of glycoconjugate polystyrene in aqueous solution. *Macromolecules* **32**: 1816-1821.
- Wells JM & Mercenier A (2008) Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. *Nat. Rev. Micro.* **6**: 349-362.
- Wells JM, Wilson PW, Norton PM, Gasson MJ & Le Page RWF (1993) *Lactococcus lactis*: high-level expression of tetanus toxin fragment C and protection against lethal challenge. *Mol. Microbiol.* **8**: 1155-1162.
- Welman AD & Maddox IS (2003) Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends Biotech.* **21**: 269-274.
- Whitfield C (1988) Bacterial extracellular polysaccharides. *Canad. J. Microbiol.* **34**: 415-420.
- Wicken AJ & Knox KW (1975) Lipoteichoic acids: a new class of bacterial antigen. *Science* **187**: 1161-1167.

- Wisselink HW, Weusthuis RA, Eggink G, Hugenholtz J & Grobben GJ (2002) Mannitol production by lactic acid bacteria: a review. *Inter. Dairy J.* **12**: 151-161.
- Wittmer CR, Phelps JA, Saltzman WM & Van Tassel PR (2007) Fibronectin terminated multilayer films: Protein adsorption and cell attachment studies. *Biomaterials* **28**: 851-860.
- Wold AE, Dahlgren UI, Hanson LA, Mattsby-Baltzer I & Midvetdt T (1989) Difference between bacterial and food antigens in mucosal immunogenicity. *Infect. Immun.* **57**: 2666-2673.
- Xiaohui Z, Daniela FB & Vincent TM (2004) Molecular basis of the dynamic strength of the Sialyl Lewis X - selectin interaction. *ChemPhysChem* **5**: 175-182.
- Xu C-P, Boks NP, de Vries J, Kaper HJ, Norde W, Busscher HJ & van der Mei HC (2008) *Staphylococcus aureus*-fibronectin interactions with and without fibronectin-binding proteins and their role in adhesion and desorption. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 7522-7528.
- Xu W, Mulhern PJ, Blackford BL, Jericho MH, Firtel M & Beveridge TJ (1996) Modeling and measuring the elastic properties of an archaeal surface, the sheath of *Methanospirillum hungatei*, and the implication of methane production. *J. Bacteriol.* **178**: 3106-3112.
- Yadav K, Bhardwaj A, Kaur G, Iyer R, De S & Malik RK (2009) Potential of *Lactococcus lactis* as a probiotic and functional lactic acid bacteria in dairy industry *Inter. J. Probiotics Prebiotics* **4**: 219-228
- Yan F, Cao H, Cover TL, Whitehead R, Washington MK & Polk DB (2007) Soluble proteins produced by probiotic bacteria regulate intestinal epithelial cell survival and growth. *Gastroenterology* **132**: 562-575.
- Zeegers-Huyskens H & Huyskens P (1991) *Intermolecular forces: A introduction to modern methods and results*. Springer, Berlin.
- Zhang X, Wojcikiewicz E & Moy VT (2002) Force spectroscopy of the leukocyte function-associated antigen-1/intercellular adhesion molecule-1 interaction. *Biophys. J.* **83**: 2270-2279.