



Université Lille 2
Droit et Santé

Université Libanaise

Ecole Doctorale des Sciences et de Technologie

Et

Université Lille II

Ecole Doctorale Biologie-Santé de Lille – Faculté de Médecine – Pôle
Recherche

THESE DE DOCTORAT EN COTUTELLE

Pour l'obtention du grade de Docteur de L'Université Libanaise et de
L'Université de Lille II

Spécialités : Microbiologie Médicale et Alimentaire ; Microbiologie et
Maladies Transmissibles.

**Interactions Coxsackievirus B4, Bactéries Intestinales et Lait Maternel
: Application à La Pathogenèse et à La Prévention du Diabète de
Type-1**

Présentée et soutenue par :
Khalil Antoine EL Kfoury

Le 15 décembre 2016

Devant le jury composé de :

Dr. Catherine Mullié-Demilly (HDR)	Rapporteur
Pr. Sima Tokajian	Rapporteur
Pr. Nabil Haddad	Examineur
Pr. Didier Hober	Examineur
Pr. Marie-Bénédicte Romond	Directrice de thèse
Pr. Fouad Dabboussi	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier ici les personnes qui ont contribué à l'aboutissement de ce travail de thèse.

- Au Professeur Marie-Bénédicte ROMOND et à tout le personnel de son équipe, en particulier à Dr Scuotto, Frédéric, Soune, Vos qualités scientifiques et humaines m'ont été indispensables. Je vous en suis sincèrement reconnaissant.

- Au Professeur Didier HOBBER, mon directeur de laboratoire, qui m'a accueilli dans son laboratoire et m'a fait confiance. Sa disponibilité, ses conseils avisés, son expérience et sa rigueur ont permis la réalisation de ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

- A tout le personnel du Laboratoire de Virologie et en particulier à Dr Famara, Delphine, Dr Pierre-Emmanuel, Dr Ilka, Dr Swan, Sophie, Dr Kazali, ...pour l'accueil chaleureux, la bonne humeur, les conseils et la patience.

- Au Professeur Monzer Hamze, toute ma gratitude pour le travail réalisé ensemble.

-Au Professeur Fouad Dabboussi, qui m'a fait confiance. Sa disponibilité, ses conseils avisés, son expérience sa rigueur ont permis la réalisation de ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je ne saurais terminer ces remerciements sans exprimer ma profonde gratitude à mes parents pour le soutien et la patience, à ma famille et à tous mes proches.

Résumé

L'objectif de ce travail est d'étudier l'effet de souches de bifidobactéries vis-à-vis de l'infection de cellules HEp-2 par le *Coxsackievirus* B4 (CV-B4). Deux souches (*Bifidobacterium breve* CFPL C50, *B. longum* CBi0703) sur les cinq évaluées protègent le tapis cellulaire, par incubation avec le CV-B4 avant infection des cellules HEp-2. La préincubation des souches avec les cellules ne les protège pas de l'infection. Les lipoprotéines de la paroi cellulaire, sécrétées dans le milieu de culture sous forme d'agrégats par les deux souches, inhibent la propagation virale par incubation avec le CV-B4 avant infection des cellules HEp-2. La séquence protéique de la lipoprotéine est le support de l'activité comme l'indique l'efficacité anti-virale de la protéine recombinante. La protéine reste fixée sur le virus après ultrafiltration suggérant qu'elle est liée à la capsid virale. Deux zones bifides montrent *in silico* une forte homologie avec les zones correspondant aux empreintes du CV-B sur le récepteur des Coxsackievirus (CAR). Les calculs d'affinité vont dans le sens d'une affinité de ces séquences bifides à la capsid virale supérieure à celle des séquences correspondantes de CAR. L'étude d'amarrage moléculaire *in silico* (Docking) indique également que les peptides de *B. longum* et de *B. breve* peuvent reconnaître les mêmes acides aminés sur le virus que le récepteur CAR.

En conclusion, certaines lipoprotéines de paroi des bifidobactéries ont des propriétés anti-virales vis-à-vis des Coxsackievirus B par mimétisme protéique avec le récepteur CAR. Elles agiraient comme un leurre empêchant la reconnaissance par le virus du récepteur CAR, prévenant ainsi l'infection.

Summary

The present work aims at investigating the possible anti-viral properties of bifidobacteria against Coxsackievirus B4 (CV-B4). Two strains (*Bifidobacterium breve* CFPL C50, *B. longum* CBi0703) among five were shown to protect the cell layer when bifidobacteria were incubated with CV-B4 prior HEP-2 cells infection. In contrast, the selected strains incubated with the cells prior CV-B4 inoculation did not induce cell protection. Cell wall lipoproteins secreted in aggregated forms in the culture broth, inhibit as well the viral propagation by contact with CV-B4 prior HEP-2 cell infection. The protein sequence from the lipoprotein supports the anti-viral activity as demonstrated by the protective effect of the recombinant protein. Protection was preserved when mixture of CV-B4 and recombinant protein was subjected to ultrafiltration, suggesting a possible binding of the bifidobacterial protein to the viral capsid. *In silico* two bifidobacterial sequences exhibit high homologies with CV-B footprint sequences onto Coxsackievirus receptor (CAR). Affinity calculation pointed out a putative lower energy binding of bifidobacterial sequences to the viral capsid as compared to the one of CAR sequences. Molecular Docking indicated as well that *B. longum* and *B. breve* peptides share with the CAR receptor amino-acids contact onto the virus. In conclusion, bifidobacteria cell wall lipoproteins exhibit antiviral proprieties against Coxsackieviruses B by mimicking virus footprint sequences onto CAR receptor. They would act as a decoy preventing virus recognition by CAR receptor, thereby preventing infection.

Sommaire

Liste des abréviations	8
Liste des tableaux	11
Liste des figures	12
CHAPITRE 1 : Introduction	15
I. Diabète de Type 1 et entérovirus	15
I.1 Diabète de type 1	
I.2 Coxsackievirus	16
1.2.1 Classification	16
1.2.2 Epidémiologie et pouvoir pathogène	19
1.2.3 Organisation structurale et génomique des CV-	20
B	
I.2.4 Cycle de réplication	23
II. Les Bifidobactéries	25
II.1 Historique et taxonomie	25
II.1.1 Genre	25
II.1.2 Espèces	26
II.2 Composition de la paroi des bifidobactéries	28
II.2.1 Peptidoglycane	28
II.2.2 Acide lipoteichoïque	29
II.2.3 Protéines et lipoprotéines de la paroi	30
II.2.4 Adhésines, Pili et fimbriae	32
II.2.5 EPS	34
II.3 Physiologie	36
II.3.1 Métabolisme des sucres	37

II.3.2	Température	37
II.3.3	Influence du pH	38
II.3.4	Résistance à la bile	39
II.4	<i>Bifidobacterium</i> et infections virales	39
<u>TRAVAUX PERSONNELS</u>		
	<u>Objectifs de notre étude</u>	41
	<u>Chapitre 2 : Matériels et Méthodes</u>	42
I.	Matériels	42
I. 1.	Cellules	
I. 2.	Virus	42
I. 3.	Souches de bifidobactéries	42
I. 4.	Complexes bifides et Protéine recombinante	42
II.	Méthodes	
II. 5.	Quantification de l'Effet Cytopathique (ECP) et progénie	44
II. 6.	Préparation et dénombrement des suspensions de bifidobactéries	44
II.7.	Analyse de l'effet cytotoxique des bifidobactéries et des complexes bifides	47
II. 8.	Protocoles d'étude des effets antiviraux des bifidobactéries, des complexes bifides et de la protéine recombinante (rPr)	47
II. 8.1	Effet protecteur des bifidobactéries, des complexes bifide ou de la protéine recombinante par contact avant infection	47
II. 8.2	Contact avec les complexes bifides après infection des cellules HEp-2 par le Coxsackievirus B4	48
II. 9.	Evaluation de liaison entre CV-B4 & rPr	49
II. 10.	Recherche de zones homologues entre les lipoprotéines bifides et le récepteur CAR.	50
II. 11.	Calcul de l'arrimage moléculaire (Docking)	50
II. 12.	Analyse statistique	51
	<u>Chapitre 3. Résultats</u>	52
I.	Choix des méthodes de mesure de la viabilité cellulaire	52
II.	Effet cytotoxique des bifidobactéries et des complexes bifides	60

III. Protection par les bifidobactéries des cellules HEp-2 vis-à-vis de l'infection par le CV-B4	63
III.1 Incubation des bifidobactéries avec le CV-B4 avant infection des cellules HEp-2	63
III.2 Incubation des bifidobactéries avec les cellules HEp-2 avant infection par le CV-B4	65
IV. Protection par les complexes bifides des cellules HEp-2 vis-à-vis de l'infection par le CV-B4.	66
IV.1 Incubation des complexes bifides avec le CV-B4 avant infection des cellules HEp-2	66
IV.2 Incubation des complexes bifides avec les cellules HEp-2 avant infection par le CV-B4	73
IV.3 Traitement par les complexes bifides des cellules HEp-2 infectées par le CV-B4	73
V. Identification des structures impliquées dans l'effet anti-CV-B des complexes bifides	76
V.1. Complexes bifides produits à pH régulé	76
V.2. Produits de dégradation des complexes bifides par traitement thermique en conditions acides	79
V.3. Protéine recombinante	82
V.4 Évaluation de la liaison CVB4-B1 rPr après application de force centrifuge	84
VI. Analyse de la reconnaissance des CV-B par la protéine des complexes bifides	85
VI.1. Recherche in silico au sein des complexes bifides de zones homologues aux empreintes du virus sur le récepteur CAR	85
VI.2 Effet protecteur de la vitalité cellulaire par incubation de la protéine recombinante avec le CV-B3	87
VI.3 Calcul de l'arrimage moléculaire entre la VP1 du CV-B3 et la protéine	89
<u>Chapitre 4 : Discussion</u>	91
I. Bifidobactéries et CV-B4	91
II. Complexes bifides et CV-B4	94
Conclusion et perspectives	97
Références	98

LISTE DES ABBREVIATIONS

µl	microlitre
Å	Ångström
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AKT	protéine kinase B
Ala	Alanine
ALT	Acide lipotéchoïque
AR2	Résistance à l'acide
ARN	Acide RiboNucléique
ASN	Asparagine
BSA	Bovine Serum Albumin
CAR	Coxsackievirus and Adenovirus Receptor
CDC	Centre de Contrôle des Maladies (USA)
CFPL	Collection Faculté de Pharmacie de Lille
CHAP	Cystéine ; Histidine ; Amidohydrolase ; Peptidase
CO ₂	Dioxyde de carbone
Cre	élément de réplication Cis
CV	Coxsackievirus
DAF	Complément de facteur accélérant le Déclin (Decay Accelarting Factor)
Dnak	cell bound lipases from <i>Burkholderia</i> sp
dNTP	Déoxyribonucléotidetriphosphate
DO	densité optique
DT1	Diabète Type 1
ECP	Effet Cytopathique
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
EPS	ExoPolysacharrides
F140911	complexe bifide (lipoprotéine) de <i>B. longum</i> CBi0703 à pH non-régulé
F230108	complexe bifide (lipoprotéine) de <i>B. longum</i> CBi0703 à pH régulé
FCPL-C50	complexe bifide (lipoprotéine) de <i>B. breve</i> FCPL-C50 à pH non-régulé
FFU	Focus Forming Units
FOS	Fructo- OligoSaccharides
GADC	Glutamate/gamma-aminobutyrate

GC	Guanine-Cytosine
Glu	Glutamine
GLY	Glycine
Gro EL	protéine Gro EL
HCl	acide chlorhydrique
HEp-2	Cellules de cancer épidermoïde humain
HLA	Human Leucocytes Antigens
Hsp	protéine de choc thermique Heat shock protein
IFN	interféron
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IPEC-J2	Cellules épithéliales non-tumorales de l'intestin de porc
IRES	site d'entrée ribosome interne
Kcal	kilocalories
log	logarithme
MEM	Milieu Eagle Minimum
Min	minute
MOI	Multiplicity Of Infection
NAG	N-Acetyl-D- glucosamine
NAM	acide muramique
ng	nanogramme
NK	Natural Killers
nm	nanomolaire
Orn	Ornithine
ORF	Open Reading Frame (Cadre de lecture)
P1; P2; P3, VP	Protéines des entérovirus
PBS	tampon phosphate salin
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PHE	Phénylalanine
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase K
PTB	protéine de liaison de polypyrimidine
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
rPr	protéine recombinante
SD	Déviation Standard

SDS-PAGE	Sodium Dodécyl Sulfate
Ser	Sérine
β	bêta
SVF	Sérum veau fœtal
Tad	Domaine de transactivation
TCID ₅₀	Dose infectant à 50% la culture de tissu
Thr	Thréonine
TLR	Récepteur de type Toll
TNF	Facteur de nécrose tumorale
ufc	unité formant colonie
V/V	rapport volume à volume
Vo	titre viral de l'inoculum (TCID ₅₀ /ml)
VPg	protéine virale liée au génome
VSV	Virus de la Stomatite Vésiculeuse
Vt	titre viral (TCID ₅₀ /ml) du surnageant collecté 24 ; 48 et 72h après inoculation
XOS	Xylo-OligoSaccharides

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau 1 : Taxonomie de la famille des *Bifidobacteriaceae*

Tableau 2 : Composition des extraits bruts analysés par chromatographie de gel filtration

Tableau 3 : amorces utilisées pour quantifier les bifidobactéries

Chapitre 3

Tableau 4: Evaluation au cours du temps de l'effet cytopathique de CV-B4 sur les cellules HEp-2 en fonction du traitement par les bifidobactéries

Tableau 5: Evaluation de la vitalité cellulaire après 48h d'incubation des cellules HEp-2 par la coloration Upti-blue.

Tableau 6: Evaluation de la vitalité cellulaire après 48h d'incubation des cellules HEp-2 par la coloration Crystal violet

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1a. Classification des *Picornaviridae*

Figure 1b. Structure des CV-B

Figure 2. Structure tridimensionnelle de la capside du Entérovirus EV-A71

Figure 3. Représentation schématique de l'organisation du génome d'un entérovirus

Figure 4a. Arbre phylogénétique du genre *Bifidobacterium* basé sur la comparaison des séquences d'acides aminés BifCOG

Figure 4b. Traduction et répllication du génome des entérovirus

Figure 5. Modélisation de la structure de la protéine de *B. longum* CBi0703 et de *B. breve* C50

Chapitre 2

Figure 6 : Séquence de la protéine recombinante rPr

Figure 7. Définition du score de l'effet cytopathique (grossissement 10x).

Chapitre 3 :

Figure 8. Effet cytotoxique des bifidobactéries et des complexes bifides

Figure 9. Viabilité cellulaire analysée par la coloration au crystal violet après 24h 48h et 72h d'incubation en présence de doses croissantes de *B. longum* CBi0703.

Figure 10. Viabilité cellulaire analysée par crystal violet après 24h ,48h et 72h d'incubation en présence de doses croissantes de complexes bifides de *B. longum* CBi0703 (production F121011).

Figure 11. Viabilité cellulaire après infection par le CV-B4 pré-incubé avec *B. longum* CBi0703 ou *B. breve* CFPL C50

Figure 12. Effet de l'incubation de cellules HEp-2 avec des bifidobactéries sur la viabilité cellulaire 24h après infection par le CV-B4

Figure 13. Effet cytopathique du virus CV-B4 incubé en présence de doses croissantes de complexes bifides CBi0703 (production F121011) et viabilité cellulaire des cellules HEp-2 par coloration au crystal violet.

Figure 14. Effet cytopathique du virus CV-B4 incubés en présence de doses croissantes de complexes bifides CBi0703 et viabilité cellulaire des cellules HEp-2 (production F140911)

Figure 15. Effet cytopathique du virus CV-B4 incubé en présence de doses croissantes de complexes bifides *B. breve* CFPL C50 et viabilité cellulaire à 48 et 72h post-incubation.

Figure 16. Titrage viral des cellules infectées par le CV-B4 incubé avec des doses croissantes de complexes bifides après 24; 48 et 72 d'incubation.

Figure 17. Effet de la supplémentation répétée du milieu en complexes bifides CBi0703 (production F140911) sur la viabilité des cellules HEp-2 après infection par le virus Coxsackie B4 (CV-B4).

Figure 18. Effet cytopathique et viabilité cellulaire après inoculation de CV-B4 pré-incubé avec des complexes bifides produits à pH neutre (F23).

Figure 19. Progénie virale mesurée à partir des surnageants de culture de cellules infectées par le CV-B4 préincubé avant inoculation avec des doses croissantes de complexes bifides (F23) produits à pH neutre.

Figure 20. Effet du traitement acide à chaud sur l'efficacité protectrice des complexes bifides

Figure 21. Effet du traitement acide à chaud sur l'efficacité protectrice des complexes bifides.

Figure 22. Effet cytopathique de la Pré-incubation de la Protéine recombinante avec le CV-B4 24h et 48h post-infection.

Figure 23. Incubation de la Protéine recombinante de *B. longum* avec CV-B4 E2 empêche HEp-2 infection des cellules.

Figure 24. Évaluation de la liaison CVB4-B1/rPr 48 heures après l'infection.

Figure 25. Recherche in silico au sein des complexes bifides de zones homologues aux empreintes du virus sur le récepteur CAR

Figure 26. Effet cytopathique de la Pré-incubation de la Protéine recombinante avec le CV-B3, 24h et 48h post-infection.

Figure 27. Interaction entre coxsackievirus B et le north canyon rim empreinte CAR ou les LpAs homologues peptides

Figure 28. Interaction entre coxsackievirus B et le north canyon rim empreinte CAR ou les LpAs homologues peptides.

I. Diabète Type 1 et entérovirus**I.1 Diabète de type 1**

Le diabète type 1 (DT1) est une maladie auto-immune caractérisée par une hyperglycémie prolongée, due à la destruction des cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. Ces cellules sont spécialisées dans la production d'insuline, leur destruction entraîne un déficit de production ou l'absence de sécrétion de l'insuline par le pancréas. La présence d'auto-anticorps atteste une réaction auto-immune. Chez les patients atteints de diabète de type 1, les lymphocytes T reconnaissent des molécules du soi présentes dans les cellules β du pancréas. Les symptômes apparaissent plusieurs mois ou plusieurs années après le début du diabète quand plus que 80 % des cellules β sont détruites. Le DT1 peut affecter aussi bien les enfants que les adolescents et même les adultes (Jaidane et al., 2010).

Les symptômes et les signes cliniques les plus fréquents induits par le DT1 sont une polydipsie, une sensation de faim, une polyurie et une perte de poids. Parmi les complications associées à la maladie, on note la cécité, l'insuffisance rénale, les atteintes du système nerveux, et l'accélération de l'athérosclérose.

L'apparition de la réaction auto-immune serait liée à l'association de gènes de prédisposition et de facteurs environnementaux : aucun gène ne peut expliquer à lui seul la maladie. En dehors de rares cas de diabète de type 1 d'origine monogénique, les variants génétiques associés à cette forme de diabète sont multiples. Le plus important d'entre eux découvert à ce jour est localisé dans le système HLA, impliqué dans la tolérance immunitaire vis à vis à des cellules du "soi". Récemment, les infections aux entérovirus sont présentées comme les principaux facteurs de risque environnementaux intervenant dans la pathogénèse du DT1. Les

données épidémiologiques montre une incidence élevée au DT1 due aux infections entérovirales chez les patients récemment diagnostiqués avec le DT1 que chez les sujets sains (Hober and Sauter, 2010; Jaidane et al., 2010). La détection d'entérovirus dans divers tissus chez des patients atteints du DT1 suggère une association entre ces virus et la maladie. En particulier, les études faites par biologie moléculaire ont montré une association significative entre l'infection par les entérovirus et le DT1, les Coxsackievirus B (CV-B) étant les virus les plus fréquemment retrouvés et décrits dans la littérature. Néanmoins, à ce jour les liens physiopathologiques entre infections par les CV-B et le DT1 restent à documenter. L'objectif à long terme est de prévenir l'infection par les CV-B, en particulier par le CV-B4 pour contrôler l'incidence du DT1.

I.2 Coxsackievirus B

I.2.1 Classification

Les coxsackievirus B (CV-B) appartiennent au genre Entérovirus et à la famille des *Picornaviridae*. La famille des *Picornaviridae* appartient à l'ordre des Picornavirales et comporte actuellement 29 genres (Woo et al., 2016).

Le genre *Entérovirus* comprend plus de 250 virus regroupés en douze espèces dont sept peuvent causer des maladies chez l'homme (*Entérovirus A-D*, *Rhinovirus A-C*) (Tapparel et al., 2013). Les coxsackievirus ont été initialement classés en 2 groupes en fonction de leur pouvoir pathogène : les CV-A induisaient une paralysie flasque avec atteinte du muscle cardiaque et squelettique tandis que les CV-B provoquaient une paralysie spastique avec une atteinte tissulaire plus variée impactant le système nerveux central, le foie, le pancréas et le muscle (Crowell and Landau, 1997). Actuellement, les *coxsackievirus A* se retrouvent dans les espèces *Enterovirus A*, *B* et *C*, tandis que les *coxsackievirus B* (1-6) sont inclus uniquement dans l'espèce *Enterovirus-B* (Figure 1a).

Figure 1a. Classification des *Picornaviridae* [<http://www.picornaviridae.com>] October 2012. *EV*: *enterovirus* ; *RV*, *rhinovirus*; *CV*: *Coxsackievirus* ; *PV*: *poliovirus* ; *Echo* : *echovirus*. Adaptée de Tapparel et al., 2013.

Picornaviridae

Genres et espèces détectés uniquement chez l'animal

Aphthovirus
Erbovirus
Teschovirus
Sapelovirus
Senecavirus
Avihepatovirus
Tremovirus
Passerivirus

Enterovirus

Parechovirus

Hepatovirus

Cardiovirus

Kobuvirus

Cosavirus

Salivirus

EV-A

EV-

EV-D

EV-C

RV-A

RV-B

RV-

EV-E
EV-F
EV-G
EV-H

CV A2-8;
10; 12; 14;
16.
EV -A 71;
76;
89-92;
114;
119-121.

CV A-9
CVB1-6
Echo V1-9;
11-21; 24-27;
29-33
EV B- 69;
73-75; 77-88;
93; 97-101;
106; 107;
110-113.

EV-D 68;
70; 94;
111; 120.

CV A-11; 13;
17; 19-22;
24.
PV 1-3.
EV C- 95; 96;
99; 102; 104;
105; 109;
116-118.

RV A1; 2;
7-13; 15; 16;
18-25;
28-34; 36;
38-41; 43;
45-47; 49-51;
53-68; 71
73-78;
80-82; 85;
88-90; 94; 96;
100-109.

RV -B3-6;
14; 17; 26;
27; 35; 37;
42; 48; 52;
69; 70; 72;
79; 83; 84;
86; 91-93;
97; 99;
100-106.

RV-C
1-55.

Espèces détectées chez l'homme

I.2.2 Epidémiologie et pouvoir pathogène

Les CV-B sont transmis par voie fécale-orale ou par transmission respiratoire, selon le type.

Les CV-B ont deux sites de réplication primaires, le tractus gastro-intestinal et les voies respiratoires, d'où le virus peut se propager aux organes cibles via la circulation sanguine.

Les entérovirus affectent des millions de personnes dans le monde chaque année, et sont trouvés dans les sécrétions respiratoires et dans les selles des personnes infectées (CDC, 2014). Les CV-B sont associés à une grande variété de manifestations, allant des infections respiratoires et gastro-intestinales légères, de l'herpangine et de la fièvre aphteuse (HFMD), à des maladies plus graves comme la pleurodynie, l'hépatite, la myopéricardite, la pancréatite, la méningite, l'encéphalite, la paralysie et la septicémie néonatale (van der Linden et al., 2015).

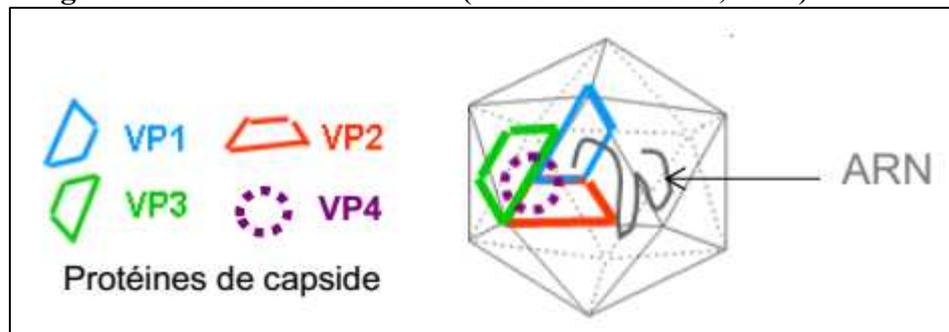
Les coxsackievirus B sont responsables de pathologies cardiovasculaires (vascularite ; cardiomyopathie dilatée), d'atteintes du système nerveux, d'infections materno-fœtales, d'atteintes musculaires (maladie de Bornholm) et sont impliqués dans le diabète de type 1.

Les anticorps anti-coxsackievirus B sont détectés plus fréquemment dans le sang de patients diabétiques récemment diagnostiqués par rapport aux témoins sains (Lind et al., 2012) ; (Yeung et al., 2011). De plus, des particules d'ARN entérovirales ont été détectées dans le pancréas de patients diabétiques de type 1, et non dans le pancréas de donneurs sains (Dotta et al., 2007). Dans un modèle murin de diabète de type 1, Serreze et al. ont montré que le diabète peut se développer rapidement chez les souris NOD de plus de 8 semaines d'âge (Serreze et al., 2000). D'autres études ont signalé que la dose virale et le taux de réplication ainsi qu'une inhibition de régénération des îlots peuvent également favoriser le développement du diabète après une infection par CV-B4 (Hober and Sauter, 2010) ; (Flodstrom et al., 2002) ; (Yap et al., 2003) ; (Kanno et al., 2006).

I.2.3 Organisation structurale et génomique des CV-B

Les coxsackievirus B sont de petite taille (environ 30 nm), non-enveloppées, composées d'ARN monocaténaire de polarité positive (Figure 1b) (Hober and Sauter, 2010). La capside des coxsackievirus B est formée de 60 protomères constitués chacun d'un exemplaire des protéines de structure VP1-4. Cinq protomères forment un pentamère et 12 pentamères forment une capside. Les protéines VP1, VP2 et VP3 formées de 240 à 290 résidus (32.4-39.1 kDa) (Hober and Sauter, 2010) sont exhibés à la surface de la capside et VP4 est en position interne (Figure 2 A ; B).

Figure 1b. Structure des CV-B (Hober and Sauter, 2010)

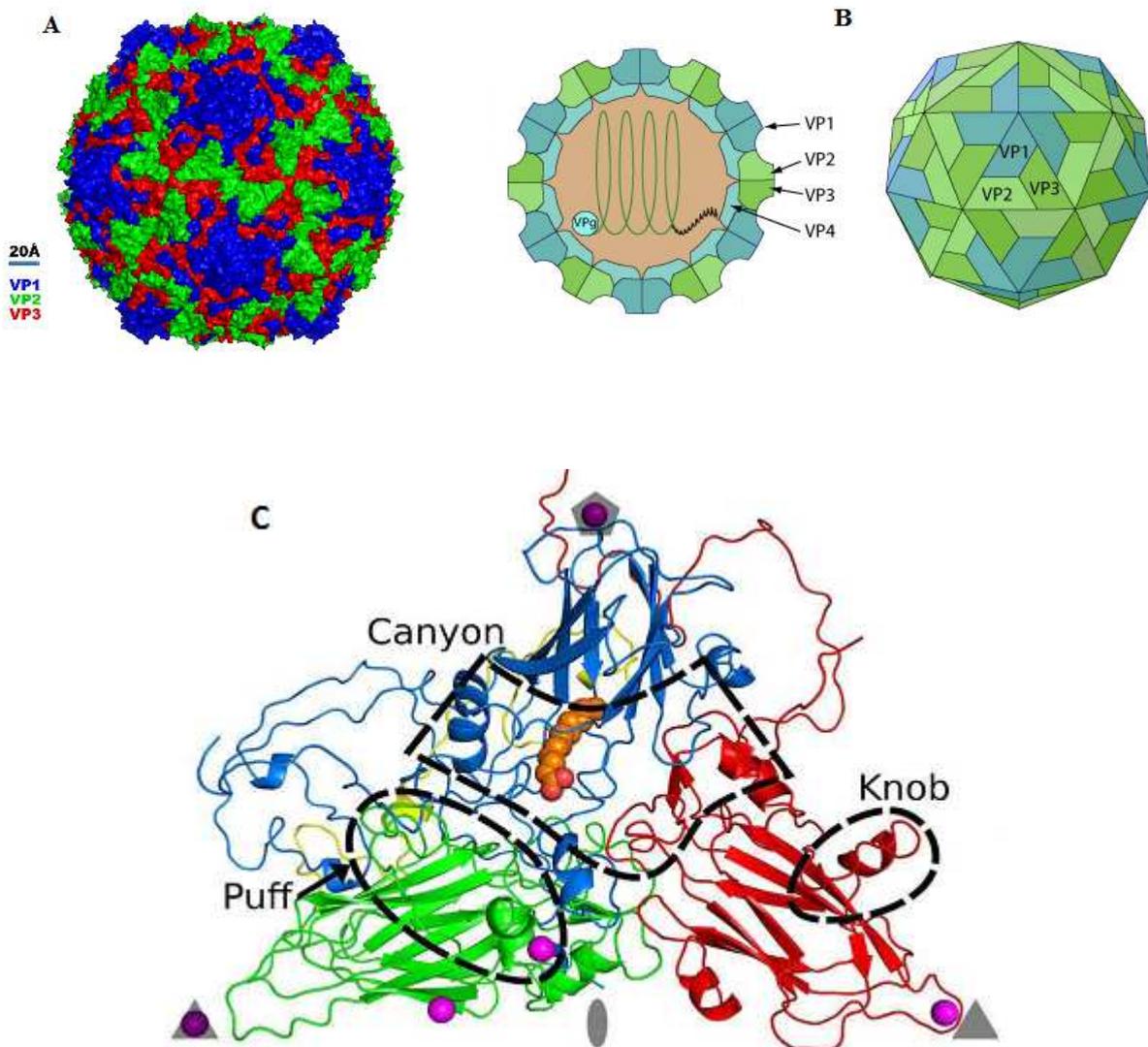


Les coxsackievirus-B présentent un canyon entourant chaque unité pentamérique de la capside (12 unités). Ce « canyon » joue le rôle de liaison/contact avec les récepteurs cellulaires. D'autre part, la bordure sud du « canyon » est formée d'une boucle particulièrement proéminente de VP2, appelée « Puff », et des boucles de VP3 forment une importante protrusion appelée « knob » (Figure 2C) (Plevka et al., 2010).

Dans le cas des CV-B, la VP1 contient une cavité ou une poche, accessible à partir d'une dépression sur la surface extérieure de la capside du virus. La VP4 est une protéine plus courte autour de 70 résidus (7 kDa) qui se trouve à la face interne de la capside avec l'extrémité N-terminale à proximité de l'axe icosaédrique quintuple. Le résidu N-terminale de

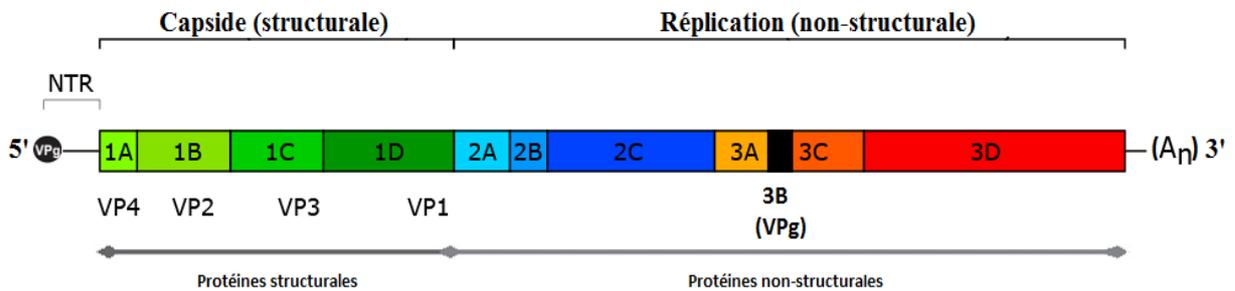
VP4 des coxsackievirus B est lié de manière covalente à la surface interne de la capside (Figure 1b) (van der Linden et al., 2015).

Figure 2. Structure tridimensionnelle de la capside du Entérovirus EV-A71. (A) La capside et les protéines de structure VP1-4. (B) Les protéines VP1, VP2 et VP3 sont exhibés à la surface de la capside et VP4 est en position interne. (Source : Swiss Institut of Bioinformatique 2008). Le diagramme d'un protomère d'EV-A71 montre les différentes protéines de capside VP1 (bleu), VP2 (vert), VP3 (rouge), VP4 (jaune). (C) Les positions caractéristiques de la surface de la capside : le canyon, le puff et le knob, sont indiquées par des pointillés (adaptée de Plevka et al., 2010).



Le génome viral du CV-B est constitué d'une molécule d'ARN (7500 nucléotides) , polyadénylé à son extrémité 3' (Hober and Sauter, 2010) et son extrémité 5' (Figure 3) est liée de façon covalente à une petite protéine virale appelée VPg (Protéine virale liée au génome) formée de 22 à 24 acides aminés (van der Linden et al., 2015). Le 5'-UTR contient un site d'entrée ribosomique interne (IRES) qui permet la traduction de l'ARN messager par la liaison du par les ribosomes (Figure 4b). La traduction de l'ARN viral aboutit à une polyprotéine qui s'autolyse en sept protéines non-structurales (2A à 2C et de 3A à 3D) (Figure 3) (Ulferts et al., 2013) dont certaines possèdent une activité enzymatique (protéases, hélicase, ARN-polymérase ARN-dépendante) et en 4 protéines structurales (VP1 à VP4) à partir d'un cadre de lecture ouvert (ORF : open reading frame) unique. La traduction commence par un clivage cotraductionnel très précoce par la protéase virale 2A (2A pro) qui permet de libérer le précurseur P1 de l'extrémité N-terminale de la polyprotéine. La protéine P1 est ultérieurement clivée par la protéase virale 3C (3C pro) pour produire les protéines de capsid VP1 et VP3 et une protéine de capsid immature VP0 qui est finalement clivée en VP4 et VP2. La région P2 est d'abord clivée en 2A pro et 2BC, et cette dernière est ensuite à l'origine de 2B et 2C. Quant à la région P3, elle est clivée en 3AB et 3CD qui donneront d'une part 3A et 3B VPg et d'autre part 3C pro et 3D pol (Figure 4b). Ces protéines possèdent une organisation commune en 8 feuillets β antiparallèles formant une structure dite en tonneau ou « jelly roll » (gâteau roulé). L'association des différentes protéines est assurée par des interactions entre leurs extrémités N-terminales et par la protéine VP4 qui est positionnée à l'intérieur de la capsid et contribue à sa stabilité structurale et son interaction avec le génome viral. L'ORF est flanqué de deux régions non codantes, impliquées dans la régulation de la traduction et de la réplication du génome (Hober and Sane, 2011).

Figure 3 : Représentation schématique de l'organisation du génome d'un entérovirus. La région 5' non codante (RNC) est conservée parmi les différents entérovirus. Adaptée de: (Zoll et al., 2009) ; (Tapparel et al., 2013).



I.2.4 Cycle de réplication : Mécanisme d'entrée, Décapsidation, Réplication de l'ARN, Assemblage des nouveaux virions et libération.

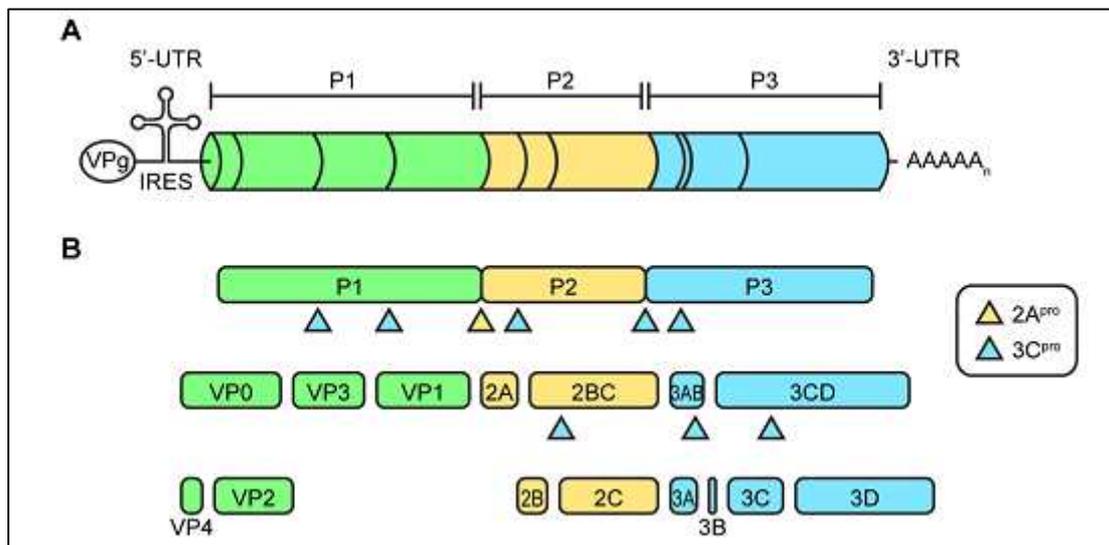
Plusieurs facteurs sont impliqués dans le cycle de réplication virale tel que : l'interaction virus/récepteur, les facteurs cellulaires (protéine de liaison de polypyrimidine, la PTB) et les éléments génomiques viraux (site d'entrée ribosome interne, IRES).

Le cycle viral des CV-B1 ; CV-B3 et CV-B5 débute par l'attachement du virus à la cellule cible par l'intermédiaire de « Decay Accelerating Factor » (DAF) CD55-like et en présence de CAR (Freimuth, Philipson, and Carson, 2008) .. Par contre l'entrée de la plupart des CV-B2 ; CV-B4 et CV-B6 nécessitent la présence du CAR mais non celle de DAF (Freimuth et al., 2008). Les études moléculaires et génétiques ont identifié CAR comme étant le récepteur cellulaire des CV-B. La molécule CAR présente une structure « Ig-Like » et est produite par un gène présent sur le chromosome 21 (van der Linden et al., 2015).

Après l'entrée et la décapsidation, le génome viral est libéré et l'ARN messager est traduit immédiatement par les polyribosomes cellulaires. La réplication de l'ARN est initiée par l'uridylation de l'amorce de la protéine VPg par la polymérase virale ARN-dépendante 3Dpol en utilisant une partie du génome viral appelée Cre « élément de réplication Cis » (Cis replication element) (Yang et al., 2002). La VPgUpU est alors allongée par 3Dpol pour

produire un brin d'ARN négatif qui à son tour est utilisé en tant que matrice pour la synthèse de nouveaux brins d'ARN positifs. Les molécules d'ARN à brin positif peuvent alors être traduits en protéine ou sont les futurs ARN génomiques intégrés dans les nouvelles particules virales. In vitro, le cycle de la réplication dure entre 6 à 8h environ dans des cellules Hela infectées (Feuer et al., 2002).

Figure 4b. Traduction et réplication du génome des entérovirus. (A) La représentation schématique du génome d'entérovirus. Le génome d'entérovirus code pour une seule polyprotéine divisée en une zone P1, P2 et P3. Aux extrémités 5' et 3', le génome contient des régions non traduites (UTR), qui sont très structurées. Le 5'-UTR contient un site interne d'entrée ribosomique pour la traduction indépendante du cap. A l'extrémité 5', le génome d'ARN est lié par covalence à la protéine virale VPg qui est utilisée comme amorce pendant la réplication de l'ARN ; (B) La polyprotéine est transformée en protéines virales et quelques précurseurs stables par les protéases virales 2A^{pro} et 3C^{pro} (et ses précurseurs).



II. Les Bifidobactéries

II.1 Historique et taxonomie

Les bifidobactéries ont été identifiées pour la première fois par Tissier à l'institut Pasteur de Paris en France en 1899. Ces bactéries ont été isolées à partir des selles des nourrissons allaités par leur mère. Tissier a nommé cette espèce *Bacillus bifidus communis*. Tous les membres du genre *Bifidobacterium* sont Gram positif, immobile, non-sporulé, non-producteur de gaz, anaérobie, et catalase négative (sauf *Bifidobacterium asteroides* et *Bifidobacterium indicum*) (Leahy et al., 2005). Les bifidobactéries peuvent se présenter sous forme de bacilles ou coccoïdes.

II.1.1 Genre

En 1924, Orla-Jensen a donné le nom de genre « *Bifidobacterium* » à des bactéries anaérobies à Gram positif et à catalase négative présentant un aspect bifide (deux queues). En 1974, le genre *Bifidobacterium* a été répertorié dans le Manuel de la bactériologie systématique de Bergey (Buchanan, 1972) . Le pourcentage de guanine-cytosine (GC%) est élevé et variant entre 50 et 60% (Mattarelli et al., 2014).

Actuellement, le genre *Bifidobacterium* est classé dans la famille des *Bifidobacteriaceae*, qui comprend les genres : *Aeriscardovia*, *Alloiscardovia*, *Bombiscardovia*, *Gardnerella*, *Metiscardovia*, *Pariscardovia*, *Pseudocardovia*, et *Scardovia*. Le genre *Bifidobacterium* appartient à l'ordre des *Bifidobacteriales*, sous-classe des *Actinobacteridae* (Mattarelli et al., 2014) (Tableau 1).

Tableau 1. Taxonomie de la famille des *Bifidobacteriaceae* (Mattarelli et al., 2014).

B.bifidum : *Bifidobacterium bifidum*; ***A.aeriphila*** : *Aeriscardovia aeriphila*; ***A.omnicolens*** : *Alloiscardovia omnicolens*; ***M. criceti*** : *Metiscardovia criceti*; ***P.denticolens*** : *Pariscardovia denticolens*; ***S.inooinata*** : *Scardovia inopinata*; ***G.vaginalis*** : *Gardenella vaginalis*.

Taxon	Espèces type	Références
Classe- <i>Actinobacteria</i>		
Ordre - <i>Bifidobacteriales</i>		
Famille - <i>Bifidobacteriaceae</i>		(Zhi et al., 2009)
Genre- <i>Bifidobacterium</i>	<i>B.bifidum</i>	(Skerman, 1980), (Orla-Jensen, 1924)
Genre- <i>Aeriscardovia</i>	<i>A.aeriphila</i>	(Simpson et al., 2004)
Genre- <i>Alloiscardovia</i>	<i>A.omnicolens</i>	(Huys et al., 2007)
Genre- <i>Metiscardovia</i>	<i>M.criceti</i>	(Okamoto et al., 2007)
Genre- <i>Parascardovia</i>	<i>P.denticolens</i>	(Jian & Dong, 2002)
Genre- <i>Scardovia</i>	<i>S.inopinata</i>	(Jian & Dong, 2002)
Genre- <i>Gardnerella</i>	<i>G.vaginalis</i>	(Greenwood, 1983)

II.1.2 Espèces

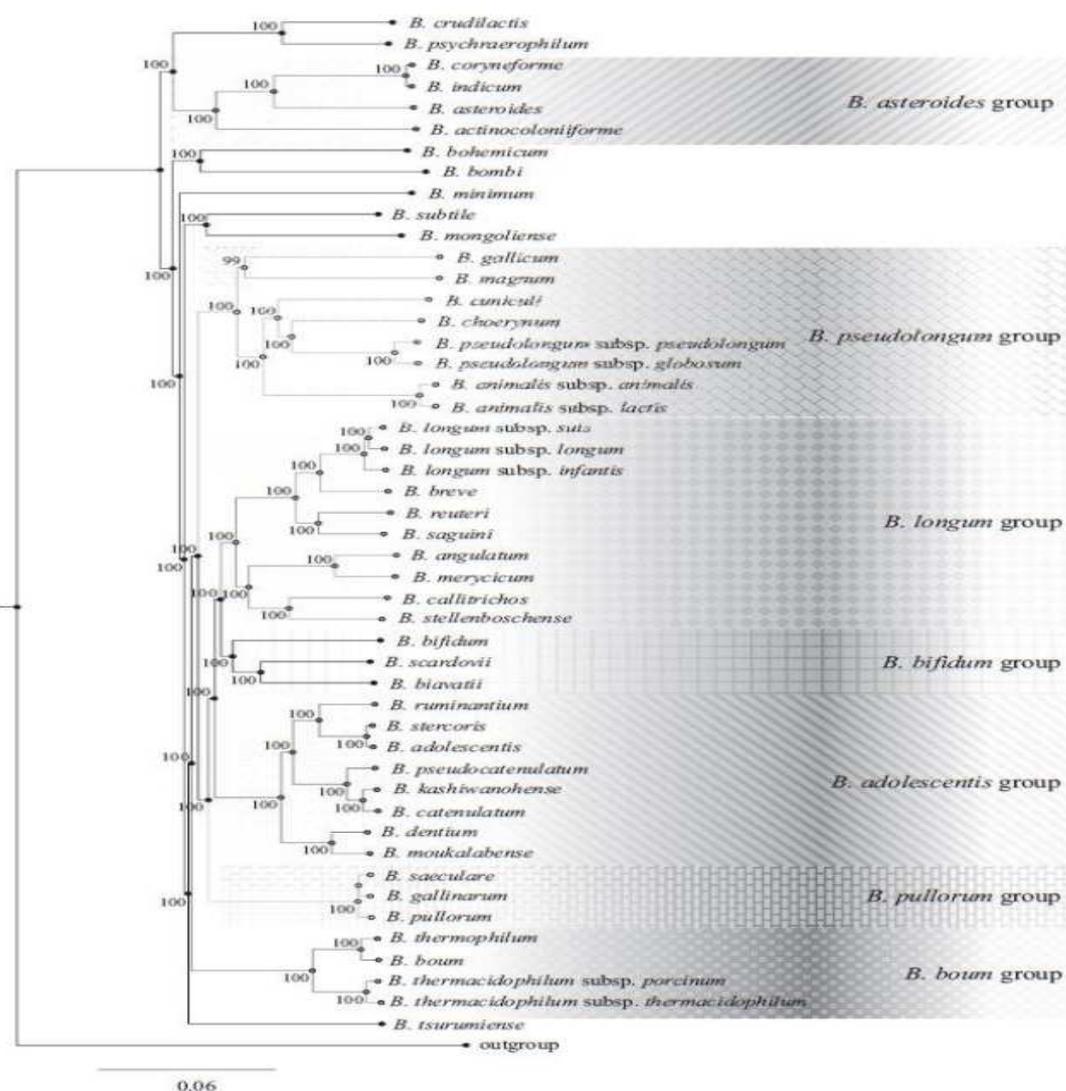
L'espèce type de bifidobactéries est *Bifidobacterium bifidum*. En 1998, Miyake, *et al* ont montré que les séquences d'ADNr 16s chez les *Bifidobacterium* présentent une homologie de 93% (Miyake et al., 1998).

Le genre *Bifidobacterium* comprend désormais plus de 40 espèces (Figure. 4) (Matsuki et al., 1999); (Ventura et al., 2005);(Zomer et al., 2009). En 2014, la note taxonomique du sous-comité fait état de 42 espèces (Mattarelli et al., 2014). Le gène codant pour la protéine de choc thermique (Hsp) analysé par la technique de PCR-RFLP permet une meilleure discrimination des espèces (Baffoni et al., 2013). D'autres gènes sont plus discriminants que le gène codant pour l'ARN16s (Junick and Blaut, 2012); (Ventura et al., 2004) ; (Ventura et al., 2006); ;(Ventura and Zink, 2003). Lugli *et al.* proposent ainsi le regroupement d'espèces réduisant à 34 espèces les 39 retenues par les auteurs (Lugli et al., 2014). En outre, 7 groupes phylogénétiques sont proposés au lieu des six précédents, avec l'ajout du groupe incluant *B. bifidum* (Figure 4).

Comme dix espèces parmi les 42 espèces du genre *Bifidobacterium*, sont entièrement séquencées (GOLD-Genome Online Database), il est probable que l'actuelle classification sera revue prochainement.

La répartition écologique des espèces chez l'homme dépend des populations étudiées. Dans une étude récente, les espèces les fréquemment isolées chez l'homme sont : *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis* (surtout chez les nouveau-nés) et *B. longum* (Jarocki et al., 2016).

Figure 4a : Arbre phylogénétique du genre *Bifidobacterium* basé sur la comparaison des séquences d'acides aminés BifCOG. Les sept groupes phylogénétiques sont mis en évidence par des motifs hachurés. Adaptée de (Lugli et al., 2014).



II.2 Composition de la paroi des bifidobactéries

La paroi des bifidobactéries est caractéristique des bactéries Gram +. Elle est constituée d'une couche de peptidoglycane contenant des protéines, des polysaccharides et des acides téichoïques.

II.2.1 Peptidoglycane

Le peptidoglycane des bifidobactéries est constitué de la chaîne oligosaccharidique alternant la N-acétyl-D-glucosamine (NAG) et l'acide muramique (NAM), et les chaînes térapeptidiques. La composition et le type de liaison des térapeptides du peptidoglycane peuvent varier entre les espèces, et entre les souches et peuvent être utilisés comme critère de différenciation (Lauer and Kandler, 1976). Ainsi, chez *B. bifidum*, ces chaînes comprennent les acides aminés suivants : l'ornithine, l'aspartate, le glutamate, l'alanine, et la sérine avec un rapport de 1: 1: 1: 1: 3: 2: 1 (Veerkamp, 1971). Les espèces *B. breve*, *B. infantis*, *B. asteroides* partagent le même motif térapeptidique composé de L-Lys-Gly alors que le motif complexe (L-Orn- L-Ser-L-Ala- L-Thr-L-Ala) est plus spécifique de *B. longum* (Schleifer and Kandler, 1972).

II.2.2 Acide lipoteichoïque

Les acides lipoteichoïques sont composés des chaînes de polyglycérophosphate et de glycolipides et sont présents chez la plupart des bactéries à Gram positif. Le diacylglycérol fixe l'acide lipotéichoïque à la membrane cellulaire. L'acide lipoteichoïque participe à la régulation des enzymes autolytiques (muramidase) de la paroi. Chez trois souches de *Bifidobacterium* appartenant à des espèces différentes (*B. longum*, *B. breve*, *B. bifidum*), on retrouve des structures dites macroamphiphiles associant des structures de glycérophosphate, de galactofuranes et de glucanes (Iwasaki et al., 1990). En outre, ces chaînes latérales peuvent être attachées à d'autres types de molécules, comme au polysaccharide-K. Le nombre de

branchements de glycérophosphate varie également entre les espèces (Iwasaki et al., 1990). Ces structures lipophiles interagissent avec l'hôte. L'injection répétée de D-galactose provenant de l'acide lipotéchoïque isolé de *B. bifidum* ralentit le vieillissement chez l'animal (Yi et al., 2009). D'autre part, l'activité anti-oxydante intracérébrale est améliorée *in vitro* et elle est associée à l'augmentation d'IL-2 et à la diminution du TNF-alpha *in vivo*.

En outre, des acides lipotéchoïques d'une souche de *Bifidobacterium* entraînent d'une part la diminution d'expression de la survivine dans les cellules LoVo en inhibant l'activité de la voie de transduction PI3K/AKT, et d'autre part l'augmentation d'expression de p53 (Wang et al., 2007). Une augmentation de l'activité des caspases est observée et se traduit par l'apoptose des cellules LoVo, suggérant une activité anti-tumorale des acides de bifidobactéries.

II.2.3 Protéines et lipoprotéines de la paroi

Plusieurs homo et hétéroprotéines sont présentes au niveau de la paroi des bifidobactéries. Dans l'intestin, ce sont les protéines de surface qui entrent en contact avec les cellules de l'hôte. Ces protéines contribuent à l'adaptation et à la colonisation bactérienne et à l'induction d'une réponse de l'hôte (Marco et al., 2006).

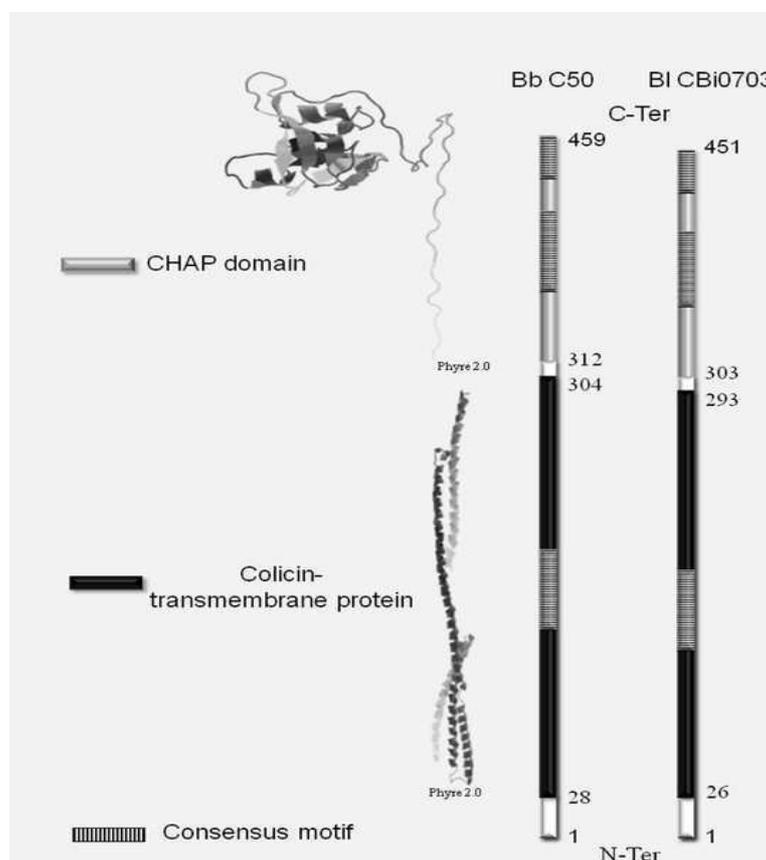
Certaines lipoprotéines de paroi sont non seulement exposées à la surface des bifidobactéries mais peuvent également être sécrétées dans le milieu de culture (Scuotto et al., 2014) ;(Scuotto et al., 2016) . Leur caractère hydrophobe empêche cependant une dissolution homogène et les lipoprotéines sont isolées sous forme d'agrégats.

L'agrégat issu de *B. breve* CFPL C50 montre une activité anti-inflammatoire par activation de la cascade impliquant le 3-kinase phosphatidylinositol des cellules dendritiques qui résulte en la production d'IL-10 (Hoarau et al., 2006) ; (Hoarau et al., 2008). La structure lipoprotéique est reconnue par les TLRs2 et 6, indiquant une diacylation de la chaîne protéique (Scuotto et al., 2014). La protéine comprend un motif lipobox (LAAC) avec une cystéine en position 25

et 2 résidus chargés positivement dans les 14 premiers résidus de la séquence signal (Figure 5).

Les agrégats comprennent également des oligosaccharides. La similitude des peptides libérés du complexe protéique de *B. breve* C50 avec le récepteur de glucane de la protéine B de *Bifidobacterium animalis*, indique que les chaînes de glucose ne sont pas liées de façon covalente à la lipoprotéine, mais sont des ligands de la fonction réceptrice du domaine CHAP. Le domaine CHAP correspond à des amidohydrolases et peptidases, cystéine et histidine-dépendantes appartenant à la famille des amidases impliquées dans l'hydrolyse des peptidoglycanes.

Figure 5. Modélisation de la structure de la protéine de *B. longum* CBi0703 et de *B. breve*C50. La structure protéique tertiaire de *B. longum* CBi0703 et de *B. breve* C50 est prédite en utilisant le logiciel Phyre 2.0. La cystéine de la lipobox est située respectivement en position 28 et 26 sur les protéines de BbC50 et BI CBi0703. Les modèles prédictifs issus de la protéine transmembranaire de la colicine et de la protéine du domaine CHAP, partagent plus que 95% d'homologie avec la protéine de *B. longum* CBi0703 et de *B. breve*. Les trois motifs consensus sont représentés en segments hachés.



Chez *B. longum* CBi0703, des agrégats comprenant à une lipoprotéine de paroi à domaine CHAP hydrophobe et des oligosaccharides sont également isolé du milieu de culture. (Figure 5). Ce complexe bifide contrairement au précédent n'est pas reconnu par les TLR2/6, probablement en raison d'une hydrophobicité augmentée déterminant une conformation empêchant le site de liaison d'être accessible aux récepteurs TLRs. Contrairement à la lipoprotéine BopA qui est impliquée dans l'adhésion de *B. bifidum*, les lipoprotéines à domaine CHAP ne semblent avoir de fonction dans l'adhésion des bifidobactéries aux cellules.

Chez *B. bifidum* MIMBb75, l'étude d'une protéine à domaine CHAP exposée à la surface cellulaire, la protéine « Tag », montre une double fonctionnalité : une activité lytique de la murine par la fonction transglycosylase, et une activité stimulante des cellules dendritiques avec la production d'IL-2 à travers le domaine CHAP (Zhurina et al., 2011); (Guglielmetti et al., 2009).

II.2.4 Adhésines, Pili et fimbriae

L'adhésion *in vitro* des bifidobactéries aux cellules humaines épithéliales intestinales est dépendante de la souche. L'adhésion dépend de l'hydrophobicité et de la capacité des bifidobactéries à autoaggréger (Del Re et al., 2000). Cette adhésion est également influencée par le pH suggérant que plusieurs mécanismes d'adhésion existent (Riedel et al., 2006).

Ainsi, le phénotype adhésif de *B. bifidum* MIMBb75 aux lignées cellulaires de carcinome du côlon humain Caco2 est apparemment lié à une lipoprotéine de surface nommée *Bopa* (Guglielmetti et al., 2009). Cette souche adhère aux cellules Caco-2 et HT-29, et l'adhésion dépend des conditions environnementales, y compris la présence de sucres et des sels biliaires, ainsi que le pH. L'adhésion de la souche MIMBb75 aux cellules Caco-2 est améliorée en présence de fructose et mannose, alors qu'elle est diminuée quand la souche est

cultivée en présence de sels biliaries bovins. Le pH affecte à la fois l'adhésion à Caco-2 et l'auto-agrégation bactérienne. Guglielmetti *et al.*, (2009) concluent que la colonisation de cette bactérie est influencée par des facteurs qui varient tout au long du trajet gastro-intestinal, telles que la présence des sucres spécifiques et des sels biliaries, ainsi que le pH. Cependant, *B. bifidum* adhère seulement sur les sites en position distale du tube digestif (Guglielmetti *et al.*, 2009). Le gène *Bopa* fait partie d'un opéron codant pour un transporteur ABC et la protéine contient un domaine transporteur ABC suggérant une bi-fonctionnalité de cette protéine (absorption de nutriments et adhésion) (Zhurina *et al.*, 2011).

Le séquençage complet du génome de *B. bifidum* S17 révèle la présence d'au-moins de 10 gènes qui codent pour des adhésines potentielles et la plupart s'exprime pendant la phase exponentielle de croissance (Zhurina *et al.*, 2011). L'augmentation de l'expression de ces adhésines est associée à l'augmentation de l'adhésion de la souche aux cellules Caco-2.

Au niveau cellulaire, les protéines des bifidobactéries sont reconnues par les glycolipides des cellules intestinales (Mukai *et al.*, 2004). Les mucines jouent également un rôle régulateur, comme le montre la réduction de l'adhérence de *B. longum* NCC 2705 et de BIF 53 traités par le lysozyme aux mucines (Izquierdo *et al.*, 2008).

Hormis le *Bopa*, d'autres appendices ou enzymes comme pili et transaldolase chez *B. bifidum* ou Pili Tad chez *B. breve*, sont impliqués dans l'adhésion des bifidobactéries aux cellules (Mukai *et al.*, 2016). Le pili et les fimbriae sont des polymères protéiques comprenant plusieurs sous-unités de haut poids moléculaire qui interviennent dans l'adhérence bactérienne via la structure du polymère (Mukai *et al.*, 2016). Chez *B. longum* BL0675 la forme monomérique a une masse moléculaire calculée d'environ 50 000 Da.

Le séquençage des génomes des *Bifidobacterium* montre que ces bactéries présentent des gènes codants pour des sortases et/ou des facteurs de transcription Trans-Activating-Domain (Tad) qui se lie à d'autres protéines telles que les corégulateurs de transcription (O'Connell

Motherway et al., 2009); (Turrone et al., 2013). La protéine Tad de *B. breve* UCC2003 est indispensable pour la colonisation de l'hôte (O'Connell Motherway et al., 2009).

D'autre part, la présence des appendices ressemblant aux pili est attestée par l'analyse microscopique de force atomique sur des souches de *B. longum subsp. longum*, *B. dentium*, *B. adolescentis*, *B. bifidum* et *B. animalis subsp. lactis*, (Faroni et al., 2011). L'expression des séquences codantes pour les appendices de *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 par *Lactococcus lactis* (dépourvu de pili), permet l'adhésion du transformant aux entérocytes humains.

II.2.5 EPS

Les exopolysaccharides (EPS) sont des polymères de haut poids moléculaire qui sont composés de sucres et sont sécrétés dans le milieu environnant. Les EPS des bifidobactéries intestinales humaines sont des hétéropolysaccharides composés de glucose, de galactose, et dans de nombreux cas, de rhamnose. Les hétéropolysaccharides sont produits en quantité plus faible que celle des homopolysaccharides (Cerning et al., 1994); (Van Geel-Schutten et al., 1999).

Des gènes codant pour les protéines produisant les exopolysaccharides sont détectés chez les bifidobactéries, mais leur structure génétique est peu conservée (Hidalgo-Cantabrana et al., 2014). La production d'exopolysaccharides (EPS) est observée chez de nombreuses souches de bifidobactéries, y compris *B. pseudocatenulatum*, *B. longum*, *B. animalis* et *B. adolescentis* (Ruas-Madiedo et al., 2008).

La régulation de la production d'EPS dépend de la composition du milieu en sucres. Roberts et al., (1995) ont montré que *B. longum* BB-79 produit la plus grande quantité d'EPS lorsque le lactose est utilisé comme la source de carbone principale dans un milieu liquide. Cette sécrétion représente une augmentation comparative de 200-300% des EPS libérés dans des

milieus contenant du saccharose, du fructose ou du glucose. Les EPS sont produites dans la phase de croissance logarithmique. Dans l'étude réalisée par Ruas-Madiedo *et al.*, en (2009) la production d'EPS par *B. animalis subsp. lactis* en présence de bile est analysée. Deux souches de *B. animalis subsp. lactis* sont utilisées. Les deux souches améliorent leur production d'EPS en présence de bile. Cette réponse à la stimulation biliaire pourrait représenter un mécanisme de protection contre ce composé toxique (Ruas-Madiedo *et al.*, 2008).

Les EPS de *B. breve* UCC2003 sont impliquées dans la colonisation de l'hôte. Des mutants de *B. breve* UCC2003 ne pouvant pas produire des exopolysaccharides résistent moins aux acides et à la bile. La souche sauvage productrice d'EPS colonise plus efficacement l'intestin de souris et a un pouvoir immunogène plus important que chez les souches mutantes (Fanning *et al.*, 2012). Cependant, même si la plupart des bifidobactéries présente le même support génétique, il reste à vérifier expérimentalement si toutes les bifidobactéries ont la capacité de produire des EPS et d'évaluer leur capacité d'interaction avec l'hôte.

Les EPS des bifidobactéries peuvent jouer un rôle dans la reconnaissance cellulaire, l'adhérence aux surfaces, et à la formation des biofilms pour promouvoir la colonisation de différents écosystèmes. Ils pourraient aussi protéger contre la phagocytose, les phages, et le stress osmotique, comme décrit chez d'autres bactéries (Looijesteijn *et al.*, 2001); (Whitfield, 1993;).

Cardelle-Cobas *et al.*, (2009) ont montré que certaines bifidobactéries sécrètent des EPS qui peuvent agir en tant que substrats fermentescibles ou prébiotiques et peuvent présenter des effets bifidogènes comme équivalents à l'inuline. Ces auteurs ont trouvé que les souches d'origine humaine de *Bifidobacterium* sécrétrices des EPS, présentent un niveau de rhamnose plus élevé que chez les souches alimentaires non-sécrétrices des EPS. Les constituants majeurs des EPS de source alimentaire sont le mannose, la fucose, et la N-acétyl-

glucosamine. La présence du rhamnose dans les EPS montre un effet protecteur contre l'ulcère gastrique chez les souris (Cardelle-Cobas et al., 2009).

II.3 Physiologie

II.3.1 Métabolisme des sucres

Les bifidobactéries sont hétérofermentaires. Elles ont le matériel enzymatique leur permettant de fermenter de nombreux hexoses pour produire de l'acide lactique et de l'acide acétique dans un ratio molaire de 2:3. Cette fermentation n'entraîne pas de production de CO₂. Comme source d'azote, les bifidobactéries ont la capacité d'utiliser les sels d'ammonium.

Les composants alimentaires non digestibles tels que les polysaccharides complexes transitent jusqu'au côlon où ils stimulent sélectivement la prolifération et/ou l'activité de populations de bactéries probiotiques *in situ* (Fooks and Gibson, 2002). La capacité des bactéries à dégrader et à métaboliser les hydrates de carbone de différents degré de polymérisation et de substitution et contenant une grande variété de motifs glycosidiques, constitue un avantage compétitif dans le tube digestif (Guarner and Malagelada, 2003); (Turroni et al., 2008). Les génomes de bifidobactéries codent pour un grand arsenal de protéines capables de cataboliser des glucides complexes. Chez *B. dentium* Bd1, environ 14% des gènes identifiés codent pour des protéines impliquées dans le métabolisme des glucides et dans les fonctions de transport (Ventura et al., 2009) (Turroni et al., 2008); (Zomer et al., 2009). Le pouvoir métabolique glucidique des bifidobactéries, augure des adaptations génétiques spécifiques bactériennes ainsi que sur leur persistance et survie dans des environnements concurrentiels riches en glucides complexes. Les bifidobactéries sont des organismes saccharolytiques capables de fermenter le glucose, le galactose et le fructose. Cependant, il existe des différences entre les différentes espèces et souches à fermenter les hydrates de carbone et les alcools. Plusieurs glycosylhydrolases des bifidobactéries restent non identifiées; cependant, les données

physiologiques confirment que les bifidobactéries peuvent utiliser une large gamme de carbohydrates tels que les xylo-oligosaccharides (XOS) (Palframan et al., 2003), la pectine (Slovakova et al., 2002), les fructo-oligosaccharides (FOS) (Kaplan and Hutkins, 2000), les oligosaccharides végétaux (Van Laere et al., 2000) et les mucines (Hoskins et al., 1985); (Ruas-Madiedo et al., 2008); (Turrone et al., 2010).

Chez *B. breve* UCC2003, l'*apoB* est responsable de l'hydrolyse de l'amidon et de polysaccharides de type glucane (O'Connell Motherway et al., 2009); (James et al., 2016). Certains bifidobactéries, comme *B. bifidum*, ont acquis des capacités métaboliques pour capter l'énergie à partir des glycoconjugués de l'hôte tels les mucines (Turrone et al., 2010). Les carbohydrases sont répertoriées chez 50 bifidobactéries (van den Broek et al., 2008), ce qui confirme que les membres de ce genre sont spécialisés dans le métabolisme glucidique.

II.3.2 Température

Elles croissent à une température optimale entre 37°C et 41°C avec des limites à 25°C et 46°C. La température optimale pour la croissance des souches de bifidobactéries d'origine humaine est compris entre 36 et 38°C, tandis que celle pour les espèces d'origine animale (Cronin et al., 2010) est légèrement supérieure (41 à 43°C) (Gavini et al., 1991), et 49,5 °C, pour *B. thermacidophilum* (Dong et al., 2000). Il n'y a de croissance bifide au-dessous de 20°C (Biavati et al., 1992), à l'exception de *B. psychroaerophilum*, qui peut croître à des températures proches de 8°C (Simpson et al., 2003). A ce jour aucune souche de *Bifidobacterium* isolée ne pousse à des températures au-delà de 49,5 °C.

Plusieurs protéines protectrices agissent comme chaperons moléculaires, tels que le *GroEL* (*Hsp60*), le *DnaK* (*Hsp70*), et le *ClpB* (*Hsp100*) (Wickner et al., 1999), qui jouent un rôle-clé dans la post-traduction pour éviter la dénaturation, l'agrégation et la traduction des protéines. Une étude par Ventura et al., (2007) détaille l'activation et le contrôle de la réponse au choc

thermique pour une souche de *B. breve* UCC2003 (Ventura et al., 2007). Récemment, un système de régulation de la réponse à la chaleur, à la pression osmotique et aux contraintes de solvant, a révélé des interdépendances entre la transcription et les régulateurs de *HspR*, *ClgR* et de *CARH* (Zomer et al., 2009).

II.3.3 Influence du pH

Les bifidobactéries croissent à un pH compris entre 6,5 et 7,0. Certaines souches peuvent pousser à un pH égal à 4. Mais on n'observe pas de croissance aux pH supérieurs à 8,0.

La croissance *in vitro* de bifidobactéries est associée à la formation d'acides organiques, qui s'accumulent au cours de la fermentation (Waddington et al., 2010). Certaines souches de bifidobactéries sont tolérantes à l'acide, avec une croissance optimale à des valeurs de pH comprises entre 6,5 et 7,0. La souche *B. animalis subsp. lactis* Bb12 est capable de survivre dans le liquide gastrique humain à un pH de 3,5 (Maus and Ingham, 2003) et au stress acide sub-létal produit lors de la culture. La translocation de protons catalysée par l'ATPase (F1F0-ATPase) joue un rôle important dans la survie des bifidobactéries dans des environnements à pH acide. La F1F0-ATPase codée par l'opéron *atp* (Ventura et al., 2004), est essentielle pour la croissance des bifidobactéries dans des conditions acides, l'activité de l'ATPase s'améliorant à pH acide et en anaérobiose (Koebmann et al., 2002); (Kullen and Klaenhammer, 1999). La souche *B. dentium* Bd1 montre une tolérance plus élevée à l'acidification, reflétant une adaptation à sa niche écologique, la cavité buccale, où l'ingestion d'aliments entraîne une baisse du pH (pH 4) (Ventura et al., 2009). Comme chez d'autres bifidobactéries, le F1F0 ATPase est codée par l'opéron *atp* chez *B. dentium* Bd1. Cependant, le génome contient aussi deux gènes juxtaposées, (BDP_1749 et BDP_1750) codant pour une glutamate décarboxylase (BDAG) et une glutamate/gamma-aminobutyrate contre-transporteur (GADC). Ces gènes sont absents chez d'autres bifidobactéries mais sont détectés chez d'autres bactéries dans le Système de Résistance à l'acide 2 (RA2) dépendant du glutamate

(Richard and Foster, 2004). Quand *B. dentium* Bd1 est exposée à des conditions acides, les gènes BDP_1749 et BDP_1750, sont surexprimés respectivement 90 et 51 fois, ce qui renforce leur rôle dans la réponse au stress acide (Ventura et al., 2009). De façon surprenante, la F1F0 ATPase n'est pas régulée suite au stress acide, ce qui indique que *B. dentium* Bd1 compense le stress acide par dégradation des acides aminés.

II.3.4 Résistance à la Bile

La capacité de résistance aux sels biliaires est variable au sein des membres du genre *Bifidobacterium* (Berrada et al., 1991);(Sanchez et al., 2007); (Waddington et al., 2010). Une adaptation efficace à des concentrations élevées de sel biliaire et à un pH bas, est utile pour augmenter la survie de bifidobactéries probiotiques dans le trajet gastro-intestinal. Par contre, la sécrétion acide et biliaire étant faible à la naissance, la résistance aux sels biliaires ou au stress acide ne paraît pas avoir un intérêt écologique important.

Récemment, des gènes impliqués dans la réponse à la bile ont été identifiés (Gueimonde et al., 2009). Ils pourraient fonctionner comme système d'efflux de la bile.

II.4 *Bifidobacterium* et infections virales

Plusieurs travaux étudient l'effet de bifidobactéries probiotiques ou de leurs métabolites pour lutter contre les infections virales. Dans une étude réalisée par Botic *et al.*, (2007), la pré-incubation des cellules non-tumorigènes porcine épithéliales intestinales (IPEC-J2) et les macrophages alvéolaires (3D4 / 2) pendant 1 heure ou pour 24h, avec des titres de 10^8 ufc/ml de bactéries probiotiques viables (VSV : *Lactobacillus spp*, *Bifidobacterium breve* et *B. longum*) réduit de 30% l'infection virale induite par le Virus Stomatite Vésiculeuse (VSV). Quarante-huit heures après l'infection, le mélange de lactobacilles et les bifidobactéries ont empêché l'infection par la liaison directe de VSV sur leur surface (Botic et al., 2007).

En 2011, Munoz *et al.*, ont trouvé que *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CECT 7210 avec une concentration de $3 \cdot 10^6$ ufc/ml protège contre l'infection des cellules rénales du singe par le *Rotavirus* ($1 \cdot 10^7$ FFU/puits) (Munoz et al., 2011). De même, l'administration orale de *Bifidobacterium longum* empêche l'infection cellulaire par le virus de l'*Influenza* en augmentant d'une façon significative la sécrétion des gènes activant les Natural Killers (NK) IFN-g, IL-2, IL-12 and IL-18 (Kawahara et al., 2015). Dans une étude réalisée par Chenoll *et al.*, une souche de *B. longum* CECT 7210 prévient l'infection cellulaire par le *Rotavirus in vivo* et *in vitro* (Chenoll et al., 2016).

Enfin, un extrait cellulaire de *Bifidobacterium adolescentis* montre des propriétés inhibitrices de réplication du CV-B3 associée à une réduction du taux d'ARN intracellulaire de 50%, (Kim et al., 2014). La réponse de la cellule est impliquée dans la protection ce qui suggère une implication éventuelle des composés de bifidobactéries dans la prévention CV-B.

Par ailleurs la réponse à la vaccination anti-polyomyélitiques est améliorée chez des bébés allaités par une formule infantile fermentée par les souches *Bifidobacterium breve* C50 et *Streptococcus thermophilus* (Mullie et al., 2004).

Des essais cliniques en cours étudient l'effet préventif anti-grippal de *Bifidobacterium animalis* (souche HN019) chez les adultes en bonne santé (étude clinique : NCT01258842).

La prévention de rhumes par *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* effet BI-04 est également à l'étude (étude clinique : NEC02679807).

TRAVAUX PERSONNELS

Objectifs de notre étude

Selon le rapport 2006 de surveillance CDC, les infections par le virus Coxsackie A16 et CV-B1-B5 représentaient 5% des entérovirus détectés dans le monde entre 1970 et 2005 (Khetsuriani et al., 2006). Aujourd'hui le CV-B4 est l'entérovirus le plus fréquemment isolé chez les nourrissons hospitalisés en Europe (Khetsuriani et al., 2006) ; (Soudee et al., 2014) ; (Roda et al., 2015), alors que CV-B3 est plus répandue en Asie (Lee et al., 2014).

Les composés actuellement utilisés pour traiter des maladies induites par des entérovirus sont des inhibiteurs de la capsidase à large spectre, qui se lient dans une poche hydrophobe de la protéine de capsidase virale (VP1), empêchant ainsi la fixation du virus aux récepteurs cellulaires et / ou de la décapsidation de l'ARN viral. Mais il est difficile d'envisager d'utiliser ce type de molécules en prévention des infections.

Les probiotiques offrent une alternative pour lutter contre ou prévenir les infections virales. Leur profil de sécurité sanitaire est attractif, en particulier pour une utilisation pédiatrique.

L'objectif de mon travail est d'étudier l'effet de bifidobactéries et de leurs lipoprotéines sur l'infection par le CV-B4 *in vitro*.

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

I. Matériels

I. 1. Cellules

Les cellules HEp-2, fournies par la société BioWhittaker (Vervier, Belgium) cultivent en milieu minimum Eagle (Gibco[®]), supplémenté par 10% sérum de veau foetal (SVF, Gibco[®]), 1% L-Glutamine, et 1% d'acides aminés non-essentiels (Gibco[®]).

I. 2. Virus

La souche virale de Coxsackievirus B4 diabétogène E2 (CV-B4 E2 fournie gracieusement par J. W. Yoon, Julia McFarlane Diabetes Research Centre, Calgary, Alberta, Canada) et un variant de la souche prototype de Coxsackievirus B3 (souche virale type CV-B3 Nancy) sont propagés sur cellules HEp-2. Les cellules HEp-2 infectées sont soumises à trois cycles de congélation-décongélation afin de libérer les particules virales. Ces dernières sont collectées par centrifugation pendant 10 minutes à la vitesse de 2000g et à une température de 4⁰C. Les surnageants de culture contenant les particules virales sont aliquotés et congelés à -80 °C.

I. 3. Souches de bifidobactéries

Les souches de *Bifidobacterium* type *longum* CFPL 02073, 02169, 02170 (collection de la Faculté de Pharmacie de Lille, EA3610), *B. longum* CBi0703 (collection de Bifinove, Lille, France) et *B. breve* CFPL C50 (collection de la Faculté de Pharmacie de Lille, EA3610) sont utilisées dans la présente étude (Scuotto et al., 2014). Les souches sont conservées en bouillon Rosenow (Bio-rad, France) à -20°C.

I. 4. Complexes bifides et Protéine recombinante

Les complexes bifides et la protéine recombinante sont fournis gracieusement par la société Bifinove (Lille-France). Les complexes bifides sont constitués de lipoprotéines sécrétées par les bifidobactéries des espèces *B. longum* et *B. breve*. Dans le milieu de culture, les lipoprotéines forment des agrégats avec des sucres. Dans ce travail, les souches *B. longum*

CBi0703 et *B. breve* CFPL C50 sont utilisées pour produire des complexes bifides. La production des complexes CBi0703 dans le milieu dédié (Scuotto et al., 2014) est effectuée en conditions de pH régulé (F23), ou non régulé (F12, F14). Les productions de complexes à partir de *B. breve* CFPL C50 sont effectuées à pH non régulé. Après élimination des bifidobactéries par centrifugation, les complexes sont isolés des surnageants de culture par ultrafiltration séquentielle. La composition des extraits bruts en complexes bifides de haut poids moléculaire est analysée par chromatographie de gel filtration (Tableau 2).

Tableau 2 : Composition des extraits bruts analysés par chromatographie de gel filtration.

Souches	Fermentation	pH	% de complexes bifides
<i>B. longum</i> CBi0703	F121011	Non régulé	75,6
<i>B. longum</i> CBi0703	F140911	Non régulé	85,9
<i>B. longum</i> CBi0703	F230108	Régulé	6,91
<i>B. breve</i> CFPL C50	CFPL-C50	Non régulé	70,8

En outre, les complexes bifides CBi0703 sont soumis à une dégradation partielle par hydrolyse acide à chaud pendant 15 Min (Scuotto et al., 2016), le taux de complexes bifides résiduels étant quantifié par chromatographie de gel filtration.

Enfin, pour déterminer quelle est la fraction impliquée dans les interactions complexes –virus, la protéine du complexe CBi0703 est produite par génie génétique (Figure 6).

Figure 6 : Séquence de la protéine recombinante rPr

DTYSDLINAQNQHAASVQREAELKQQLAGASQDLANKVLELDDLTTNNKIVAAQAKV
TQANEDAATAQDEADAASGRLSAAQKDKETLEEQIKQTGKDYDDAHAAVAQLARD
EMHGSNASDVMSVVTGATSTQDFVNSMQSRDALSRNEANAASSAATSLSTSKNRGE
RLAAIEKQIAVLKTQADEKAASAQTAAETAQSERDALDKLRQEGEARRDELSSMIDS
LDSQSAKQAAQTVLIASQVDSYNRQFQKEQQDAANRVDGTGNQGGTPSTPVTAPAP
APAPAPAPAPAPSVGGQGTSTNGDYGNAYATGQCTYWAYERRRQMGIGTPSYLGNG
DWWRNAPSYGLRVDHNPQVGAALSFLPGQDGADGTWGHVAVVEAVYGDGTFQSE
MNVGGLWMMNYRTLTLNLGQYWFVH

II. Méthodes

II. 5. Quantification de l'Effet Cytopathique (ECP) et progénie

L'effet cytopathique du virus est analysé par observation à l'aide d'un microscope inversé (Olympus CKX41) de cellules HEp-2 infectées par le CV-B. Une semi-quantification est réalisée selon le principe suivant : la grille cellulaire apparaît dans le puits sous forme circulaire et se divise virtuellement en quatre quadrants. Ensuite, l'ECP est estimé en fonction des quadrants où il y a une cytolysse avec destruction du tapis cellulaire et exprimé, en pourcentage. Par exemple un score de 25%, indique une mortalité cellulaire dans un quadrant sur quatre (disparition du tapis cellulaire et déformation des cellules HEp-2). Un triplicata de puits au moins est lu pour la même concentration et la même souche testée.

La lecture est effectuée 24, 48h et 72h après inoculation des cellules HEp-2 par le virus, l'incubation étant réalisée à 37°C en atmosphère à 5% de CO₂. Le titre viral est déterminé dans le surnageant de culture de cellules infectées. Pour quantifier les particules virales, des cellules HEp-2 sont réparties en microplaques de 96 puits à raison de $1,25 \times 10^4$ cellules/puits et incubées pendant 24 h en atmosphère à 5% de CO₂. Des dilutions successives au 1/10e des surnageants sont effectuées en milieu MEM (10% sérum de veau fœtal (SVF, Gibco®), 1% L-Glutamine, et 1% d'acides aminés non-essentiels (Gibco®)). Elles sont inoculées dans les puits contenant les cellules HEp-2 de 24h. L'effet cytopathique est confirmé après 3 jours d'incubation à 37 °C en atmosphère à 5% de CO₂. Le titre viral est calculé en utilisant la méthode de Spearman-Kärber (Ramakrishnan, 2016) et exprimé en log₁₀ TCID₅₀/mL.

II. 6. Préparation et dénombrement des suspensions de bifidobactéries

Les bifidobactéries sont cultivées en bouillon Columbia (Difco-France) à 37 °C dans des conditions anaérobies. Les bifidobactéries sont dénombrées sur gélose Columbia (Difco-France) après 18h et 72h d'incubation à 37 °C dans des conditions anaérobies. Pour les essais de protection antivirale, les suspensions de bifidobactéries sont préparées à partir de cultures

de 10ml en bouillon Columbia. Les bifidobactéries sont collectées par centrifugation pendant 5 minutes à 11000 xg. Le culot bactérien est dispersé dans 1ml d'une solution de Ringer diluée au ¼ (Biokar Diagnostics). La solution n'est pas préalablement régénérée en eau bouillante, car le but est de tuer les bifidobactéries par oxydation. Les suspensions sont soumises à une agitation vigoureuse et lavées deux fois.

La suspension finale est congelée à -20 °C, décongelée 6h plus tard puis recongelée afin de tuer des bactéries survivantes. Le cycle est répété une fois. Pour s'assurer de l'efficacité du processus, les bactéries survivantes sont recherchées par l'inoculation de 100 µl de la suspension dans un bouillon Columbia mis en incubation pendant 7 jours à 37 °C dans des conditions anaérobies. En absence de culture, le nombre de cellules bactériennes est déterminé par PCR quantitative en temps réel (Scuotto et al., 2016). Pour ce faire, la première étape consiste en l'extraction de l'ADN bactérien à l'aide du kit NUCLEOSPIN® TISSUE (Macherey Nagel, France). Les bactéries sont remises en suspension dans 120 µl de tampon TE (20 mM Tris-HCL, EDTA 2 mM, 1% de Triton X-100). Après addition de 80 µl de lysozyme (50 mg / ml), la suspension de bactéries est incubée pendant 30 Min à 37 °C. L'ADN bactérien total est extrait en utilisant le kit NucleoSpin® Tissue (Macherey Nagel) selon les instructions du fabricant. L'élution est effectuée avec 100 µl de tampon de BE (Macherey Nagel), et les extraits d'ADN purifiés sont stockés à -20°C. La région génomique correspondant au gène de la xylulose-5-phosphate/fructose-6-phosphate phosphocétolase (Cleusix et al., 2010) est amplifiée par qPCR en utilisant le Mastercycler® ep Realplex (Eppendorf). Les amorces (Eurogentec) sont répertoriées dans le Tableau 3. Chaque mélange réactionnel de 25µl est composé de PCR Master Mix (Thermo Scientific) contenant 0,625 unités d'ADN Taq polymérase ThermoPrime, de 1,5 mM de chlorure de magnésium, de 0,2 mM de dNTP, de 75 mM Tris-HCl, de 0,01 % de Tween 20®, de 0,5 µM de chaque amorce et de 5 µl d'ADN. Les amplifications sont effectuées à l'aide d'un thermocycleur Mastercycler

® ep realplex (Eppendorf). La dénaturation initiale à 94 °C pendant 2 minutes est suivie par 40 cycles comprenant une dénaturation à 94 °C pendant 20 s, une hybridation avec les amorces pendant 30 secondes et à une température comprise entre 54 °C et 63 °C en fonction du type d'amorces utilisées, une étape d'extension à 72 °C pendant 1 Min, suivie d'une étape d'extension finale de 5 Min à 72 °C. Une analyse de la courbe de dénaturation thermique est ajoutée au programme pour déterminer la spécificité de l'amplicon. Ces produits de PCR sont également déposés sur gel d'agarose 2% pour vérifier leur taille.

Tableau 3. Amorces utilisées pour quantifier les bifidobactéries

Séquence (5'-3')	Gène cible	Taille de l'amplicon (pb)
Xfp Fw: CGCTTGTCGAATTCCTTCTT	xfp	232
Xfp Rv: AGTTCAGAAGGAGCAGCAG		

II. 7. Analyse de l'effet cytotoxique des bifidobactéries et des complexes bifides

L'évaluation de la viabilité cellulaire est effectuée à l'aide de Bleu Trypan (Sigma Aldrich) et d'Uptiblue (Uptima Interchim, France). La coloration par l'Upti BLUE mesure la viabilité cellulaire en établissant un rapport entre l'absorbance de deux longueurs d'ondes 280 et 260 nm respectivement. La toxicité des souches et des complexes bifides pour les cellules HEp-2 est validée par la coloration par le Crystal Violet, technique qui reflète la viabilité cellulaire (Poh and Pervaiz, 2005). Le protocole est le suivant : le milieu (MEM) couvrant le tapis cellulaire est aspiré et chaque puits est lavé par 150 µl de PBS. Ensuite un volume de 250 µl de la dilution au dixième de la solution commerciale de Crystal Violet (Merck-Allemagne « réf : 028K13886940 ») est ajouté à chaque puits et ces derniers sont incubés pour 15 Min à 37°C sous une pression atmosphérique de 5%. Après cette incubation, 2 lavages sont effectués avec un volume égal à 250 µl d'eau distillée par puits, suivi de

l'addition finale de 250 µl de SDS (dilué au 1% avec du PBS 1X- Gibco® « réf : 14190-094 »). Enfin, la plaque est lue en mesurant l'absorbance par le spectrophotomètre en utilisant une longueur d'onde correspondante à 595nm.

Les résultats du test de cytotoxicité et ceux de l'activité antivirale, ont été obtenus en évaluant le taux de viabilité cellulaire exprimée selon la formule précédemment décrite par (Strober, 2015) : Viabilité cellulaire = (DO de l'échantillon / DO du contrôle) *100.

II.8 Protocoles d'étude des effets antiviraux des bifidobactéries, des complexes bifides et de la protéine recombinante (rPr)

II.8.1 Effet protecteur des bifidobactéries, des complexes bifides ou de la protéine recombinante par contact avant infection.

II.8.1.1 Incubation des CV-B avec les bifidobactéries, les complexes bifide ou la protéine recombinante

Une série de dilution de raison 2 est réalisée à partir des suspensions de bifidobactéries, des complexes bifides ou de la protéine recombinante dans le milieu de culture MEM dépourvu de SVF (10%) mais contenant 1% de L-Glutamine et 1% d'acides aminés non-essentiels (Gibco®). La dernière dilution est diluée dans un milieu MEM supplémenté en 20%SVF ; 1% L-Glutamine ; 1% d'acides aminés non-essentiels (Gibco®) avant contact avec le CV-B .

Les dilutions sont incubées avec la souche de Coxsackievirus CV-B3 ou CV-B4 (concentration finale du virus: 10^3 TCID₅₀ / ml) pendant une heure avant inoculation des cellules HEp-2 (MOI = 0,004). Les microplaques sont incubées pendant 72 heures à 37 °C en atmosphère à 5% de CO₂. L'évaluation de l'effet cytopathique induit par le virus est effectuée 24, 48h et 72h post-inoculation. La vitalité cellulaire est évaluée au cours de 24 ; 48 et 72h par la coloration au Crystal Violet (Merck-Allemagne) comme décrit en **section II.7.**

En parallèle, la progénie virale est effectuée sur les surnageants de culture recueillis au cours de trois jours consécutifs respectivement 24, 48 et 72h d'infection (voir section **II.5.2**).

Les contrôles sont les suivants : (i) contrôle négatif : cellules HEp-2 cultivées dans 150 µl de milieu de culture MEM ; (ii) contrôle positif : cellules HEp-2 inoculées par la suspension virale (MOI 0.004) et (iii) contrôle échantillon : cellules HEp-2 dans 50 µl de milieu de culture MEM plus 100 µl de chaque échantillon (volume équivalent au volume d'essai du mélange virus-échantillon). Tous les contrôles sont effectués en triplicats.

II.8.1.2 Incubation des cellules HEp-2 avec les bifidobactéries/les complexes bifide avant infection par CV-B4.

Les mêmes conditions de dilution des échantillons qu'en section **II.8.1.1** sont appliquées. Par contre, les échantillons sont pré-incubés pendant une heure avec les cellules HEp-2 à 37°C, suivi par 4 lavages des puits par du milieu MEM à froid.

Ensuite, les cellules sont infectées avec le CV-B4 (concentration virale finale : 10^3 TCID₅₀/ml, MOI = 0,004) à 37 ° C, suivi de l'ajout de 100µl de MEM par puits. Les plaques sont incubées pendant 3 jours à 37 °C dans une atmosphère à 5% de CO₂. L'effet cytopathique (CPE) induit par le virus est évalué à l'aide d'un microscope inversé (Olympus CKX41) après 24, 48 et 72h d'incubation des cellules infectées. En outre, la présence ou l'absence d'effet protecteur des bactéries ou des complexes bifides est évalué en réalisant le test de viabilité cellulaire (Crystal violet voir section **II.7**).

II.8.2 Contact avec les complexes bifides après infection des cellules HEp-2 par le Coxsackievirus CV-B4

II.8.2.1 Addition unique de complexe bifide de *B. longum* CBi0703

Dans ce protocole, les cellules HEp-2 sont infectées par le CV-B4 (concentration virale finale: 10^3 TCID₅₀/ml, MOI = 0,004) et incubées pendant une heure à 37 ° C en atmosphère de 5%

de CO₂. Les particules virales excédentaires sont éliminées par 4 lavages avec MEM (dépourvu de SVF ; L-Glutamine et acides aminés non-essentiels). Le complexe bifide de *B. longum* CBI 0703 dilué de 2 en 2 est ajouté ainsi que du milieu MEM. Après addition du complexe, les cellules sont incubées pendant 3 jours à 37 °C en atmosphère à 5% de CO₂, puis examinées à l'aide d'un microscope inversé (Olympus CKX41) pour évaluer l'effet cytopathique (CPE) induit par le virus après 24, 48 et 72h de culture. La lecture des ECP, est complétée par la coloration au Crystal violet.

II.8.2.2 Renouvellement des doses de complexe bifide de *B. longum* CBI0703

Les cellules HEP-2 sont infectées par le CV-B4 E2 (MOI 0.004, soit 50 TCID₅₀/puits) et incubées pour une durée d'une heure à 37⁰C et sous atmosphère de 5% en CO₂. Une heure post-inoculation, le tapis cellulaire est lavé deux fois avec le tampon PBS. Les complexes *CBI0703* sont ajoutés dans chaque puits (titres finaux compris entre 0.003125 et 1.6 µg/ml). Les cellules sont incubées 4 heures à 37⁰C sous atmosphère de 5% en CO₂. Puis, le tapis cellulaire est lavé 2 fois avec du PBS et les mêmes doses de complexe *CBI0703* sont ajoutées. Les cellules sont incubées 16h à 37⁰C et sous atmosphère de 5% en CO₂. Les lavages/addition des complexes sont répétés une dernière fois. L'ECP est évalué 6h plus tard (24h post-inoculation) par une lecture des tapis cellulaires au microscope inversé. La lecture est effectuée 48 et 72h post-inoculation.

Les résultats des ECP sont confirmés par la réalisation du test de viabilité cellulaire avec le Crystal Violet (voir section II.7) en mesurant l'absorbance à 595 nm à 24, 48 et 72h post-incubation. Une analyse statistique est faite pour l'évaluation des lectures spectrométriques.

II.9. Evaluation de la liaison entre CV-B4 & rPr

Pour tester l'interaction entre le CV-B4 E2 et la protéine recombinante, le CV-B4 E2 est dilué dans du MEM à la concentration finale de 2.10³ TCID₅₀/ml. Parallèlement le CV-B4 E2

(2×10^3 TCID₅₀/ml) est pré-incubé avec la protéine recombinante pendant 1 heure à 37°C sous atmosphère à 5% CO₂. Enfin, la protéine recombinante (0.025 µg/ml) est incubée avec le CV-B4 E2 (2×10^3 TCID₅₀ / ml) (V/V) pendant 1 h à 37 °C, puis le mélange est centrifugé à 3500g pendant 1 h à 4°C à l'aide d'un concentrateur Vivaspin Protein Colonnes Concentrateur Spin (GE Healthcare-France). Le retentât est ensuite lavé deux fois. Le CV-B4 E2 (2×10^3 TCID₅₀/ml) dilué dans le diluant utilisé pour la protéine recombinante (V/V) est soumis au même protocole. Toutes les suspensions sont inoculées à des cellules HEp-2 mises en culture pendant 3 jours à 37°C en atmosphère de 5% en CO₂. La viabilité cellulaire est contrôlée par la coloration au Crystal violet 24 ; 48 et 72h post-infection.

II.10. Recherche de zones homologues entre les lipoprotéines bifides et le récepteur CAR.

Les séquences protéiques des lipoprotéines de *B. longum* et *B. breve* (*B. longum* GenBank # AII16098.1; *B. breve* GenBank # AII16097.1) sont alignées avec la zone consensus correspondant à l'empreinte du CV-B3 sur le récepteur CAR (GenBank # AAF24344.1) (Organtini et al., 2014) à l'aide du logiciel d'alignement ALIGN de la base Uniprot .

La conservation au sein des CV-B des acides aminés contacts avec le récepteur CAR est également analysée à l'aide du logiciel d'alignement ALIGN de la base Uniprot (Turroni et al., 2010).

II.11 Calcul de l'arrimage moléculaire (Docking)

L'analyse de l'arrimage moléculaire du CV-B3 (entrée PDB: 1cov) et la séquence peptidique correspondant à l'empreinte du virus (Organtini et al., 2014), ou les séquences peptidiques de bifidobactéries homologues, est réalisée à l'aide du logiciel Autodock Vina. Le champ sélectionné de la grille (espacement du maillage de 1 Å) englobe les régions autour de la dépression impliquées dans la reconnaissance du récepteur CAR, c'est-à-dire le rebord nord

de la dépression (north rim) sur la protéine de capsid VP1 et le renflement (puff) sur la protéine VP2n (Trott and Olson, 2010). Les forces d'interaction sont étudiées à l'aide du logiciel Biova / Discovery studio 2016 (Accelry Inc) (Abdel-Hamid and McCluskey, 2014).

II.12 Analyse statistique

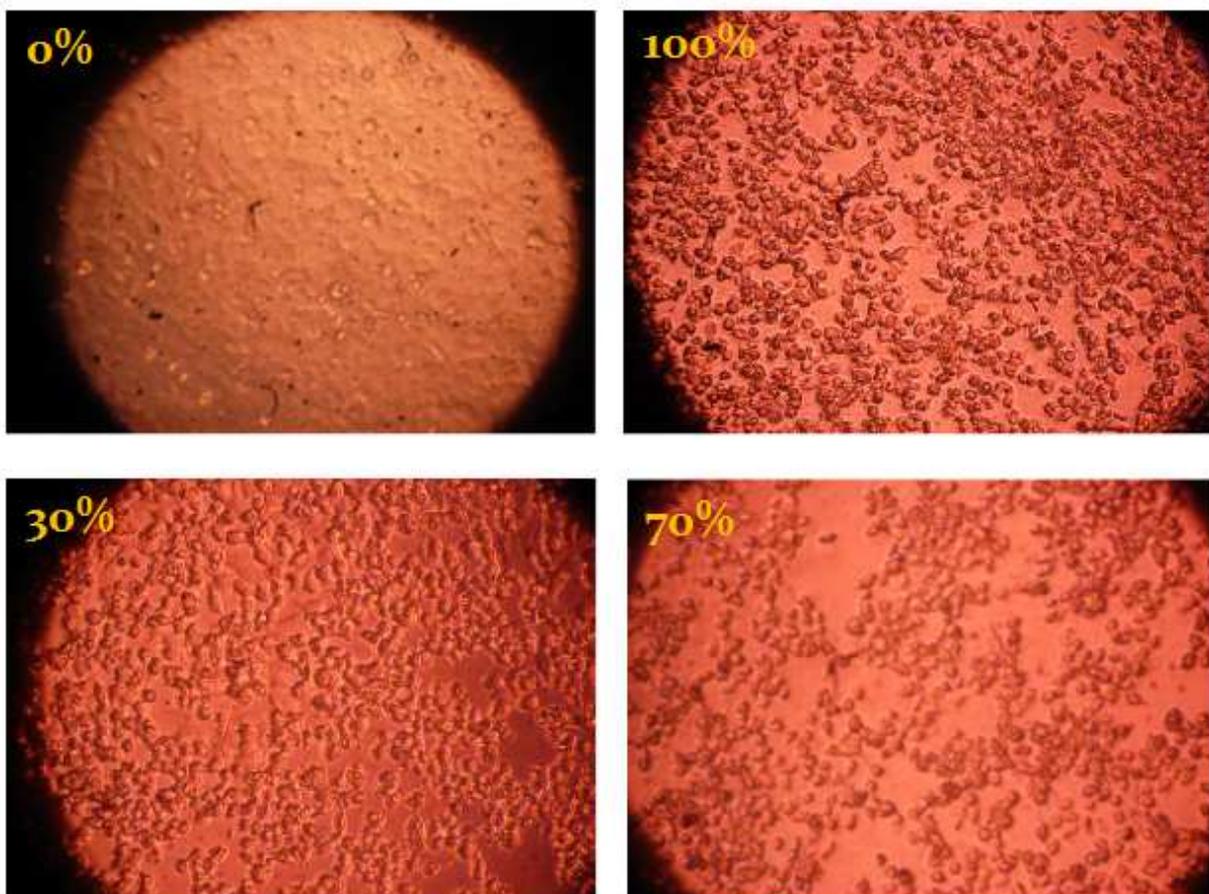
Les résultats de vitalité cellulaire sont comparés selon les traitements en utilisant le test de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaison par paire de Conover-Iman corrigé par le calcul de probabilité de Bonferroni (XLSTAT).

Chapitre 3. Résultats

I.1 Choix des méthodes de mesure de la viabilité cellulaire

Dans un premier temps, l'effet des bifidobactéries est analysé par estimation de l'effet cytopathique (ECP) induit par le CV-B4. Le tableau 4 résume les résultats d'ECP (exprimés en %) obtenus lors du contact bifidobactéries/virus ou bifidobactéries/cellules HEp-2 avant infection. Il est impossible de détecter un effet protecteur vis-à-vis de l'effet cytopathique du virus avec les souches en essai et aux concentrations utilisées (rapport de 0,1 à 100 ufc/virus ou de 4E-0,4 à 0,4ufc/cellules). Cependant, la lecture semi-quantitative de l'ECP incite à utiliser une méthode permettant de suivre de façon plus précise l'effet du CV-B4 sur la viabilité cellulaire. En outre, la grande variabilité de réponse en pourcentage d'ECP à 24h demande à améliorer la reproductibilité de la cinétique d'infection.

Figure 7. Définition du score de l'effet cytopathique (grossissement 10x).



La méthode de coloration cellulaire par l'UptiBlue donne des résultats de densité optique proches entre cellules non infectées et infectées, bien que ces dernières montrent un ECP de 100% (Tableau 5). Par contre, certaines DO élevées obtenues lors du traitement par les bifidobactéries évoquent un effet protecteur. Pour améliorer la gamme de réponse en DO entre cellules non infectées et infectées, la méthode au crystal violet a été développée (Tableau 6). On constate que la méthode permet de suivre de façon indirecte le développement de la population cellulaire. Bien que le lit cellulaire soit à confluence au moment des essais, on remarque après coloration des cellules non infectées la progression des DO entre 24h et 72h de culture, qui indique que les cellules continuent de se diviser. On voit chez les cellules infectées par le CV-B4 une chute de la DO 48h après inoculation qui se poursuit au cours du temps. L'écart entre les deux courbes permet de visualiser des évolutions intermédiaires lors du traitement par les bifidobactéries.

Tableau 4: Evaluation au cours du temps de l'effet cytopathique de CV-B4 sur les cellules HEp-2 en fonction du traitement par les bifidobactéries. ^a : rapport bactéries/virus (ufc/TCID₅₀) ou bactéries/cellules (ufc/cellules). ^b : MOI entre 0.006 et 0.005 selon les essais. ^c : ECP (%).

	contact bactéries/virus			contact bactéries/cellules		
	Bactéries/virus ^a	temps culture (heures)		Bactéries/cellules ^a	temps culture (heures)	
		24	48		24	48
Cellules infectées témoins^b	0	20-100 ^c	100	0	20-100	100
Souches	<i>Bifidobacterium longum subsp. infantis</i>					
CFPL02073	10	90	100	0,04	100	100
	1	75-80	100	0,004	60-100	100
	0,1	75	100	0,0004	90	100
	<i>Bifidobacterium longum subsp. longum</i>					
CFPL 02169	10	80-90	100	0,04	80-100	100
	1	75-90	100	0,004	75-100	100
CFPL 02170	100	25	100	0,4	100	100
	10	25-70	100	0,04	100	100
	1	90	100	0,004	100	100
CBi0703 18h	10	50	100	0,04	100	100
	1	25-75	100	0,004	100	100

CBi0703 72h	100	80	100	0,4	80	100
	10	25-80	100	0,04	80-100	100
	1	30	100	0,004	80	100
	0,1	80	100	4,00E-04	80	100
<i>Bifidobacterium breve</i>						
CFPL C50	100	50	100	0,4	50	100
	10	25-100	100	0,04	50-100	100
	1	100	100	0,004	100	100

Tableau 5 : Evaluation de la vitalité cellulaire après 48h d'incubation des cellules HEp-2 par la coloration Upti-blue

^a : rapport bactéries/virus (ufc/TCID₅₀) ou bactéries/cellules (ufc/cellules).

Viabilité (Uptiblué)		DO			
Cellules témoins non infectées		1,88 (0,04)			
Cellules infectées témoins		1,55 (0,04)			
		Bactéries/virus ^a	DO	Bactéries/cellules ^a	DO
Souches		<i>Bifidobacterium longum subsp. Infantis</i>			
CFPL02073	1	1,65		0,004	1,61
	0,1	1,56		0,0004	1,7
		<i>Bifidobacterium longum subsp.longum</i>			
CFPL 02169	10	1,65		0,04	1,56
	1	1,78		0,004	1,75
CFPL 02170	100	1,46		0,4	1,76
	10	1,65		0,04	1,66
CBi0703 18h	10	1,68		0,04	1,7
	1	1,63		0,004	1,3

CBi0703 72h	10	1,76	0,04	ND
<i>Bifidobacterium breve</i>				
CFPL C50	100	1,7	0,4	1,6
	10	1,56	0,04	1,66

Tableau 6 : Evaluation de la viabilité cellulaire par la coloration au crystal violet.

^a : rapport bactéries/virus (ufc/TCID₅₀) ou bactéries/cellules (ufc/cellules). ^b : MOI entre 0.006 et 0.005 selon les essais (n=3 essais).

Viabilité cellulaire	Bactéries/virus ^a	DO		
culture cellulaire (heures)		24	48	72
Cellules témoins non infectées	0	1,7	2,21 (0,57)	3,11 (0,18)
Cellules infectées témoins^b	0	1,2	0,76 (0,40)	0,15 (0,13)
Contact bactéries/virus				
Souches	<i>Bifidobacterium longum subsp.infantis</i>			
CFPL02073	1	0,95	0,63	0,17
	0,1	0,67	0,33	0,11
<i>Bifidobacterium longum subsp.longum</i>				
CFPL 02169	10	1,12	0,24	0,13
	1	0,68	0,47	0,1
CFPL 02170	100	1,24	0,55	0,1
	10	1,4	0,63	0,12
CBi0703 18h	10	1,64	1,07	0,16

CBi0703 72h	10	0,88	0,57	0,14
<i>Bifidobacterium breve</i>				
CFPL C50	100	1,45	0,54	0,11
	10	1,55	0,73	0,34

La sélection des souches potentiellement intéressantes a donc été menée en associant la lecture au microscope de l'effet cytopathique induit par le CV-B4 et la coloration par le crystal violet des cellules HEp-2.

II. Effet cytotoxique des bifidobactéries et des complexes bifides

Des doses de 10 à 10^7 ufc/ml de bifidobactéries mortes sont mises en culture avec les cellules HEp-2 (soit un rapport de bactéries/cellule compris entre 4×10^{-5} et 40). La recherche d'effet cytopathique est négative. La coloration au Crystal violet ne montre pas d'effet négatif sur la viabilité cellulaire en présence des bifidobactéries CFPL 02169, 02170 et C50 (Figure 8). Les résultats sont moins tranchés en présence de la souche CBi0703 cultivée pendant 72h. Il n'y a pas d'effet cytopathique, mais les cellules HEp-2 incubées en présence de concentrations de 10^3 et 10^4 ufc/ml (soit 0.004 et 0.04 ufc/cellule) pendant 48h montrent des DO significativement inférieures à celle des cellules HEp-2 seules (Figure 9b). A l'inverse, 24h plus tard soit à 72h d'incubation, non seulement les valeurs de DO sont similaires entre les cellules témoins et celles incubées en présence de 0.004 et 0.04 ufc/cellule mais encore, les cellules incubées en présence de 0.0004 ufc/cellule montre des valeurs de DO supérieures aux valeurs témoin ce qui pourrait suggérer un effet stimulant sur la croissance cellulaire dans des populations de cellules vieillissantes (Figure 9c). La souche CBi0703 cultivé pendant 18h, n'induit ni ECP ni modification des valeurs de DO par rapport aux valeurs témoins (Figure 9). Enfin, les productions de complexes bifides n'induisent pas d'effet cytopathique, ni variation significative par rapport aux lits cellulaires témoins des valeurs de DO après coloration au crystal violet, comme l'illustrent les résultats en présence de complexes de *B. longum* CBi0703 (Figure 10).

Figure 8. Viabilité cellulaire analysée par la coloration au crystal violet en présence de doses croissantes de *B. longum* (CFPL 02169, 02170) et *B. breve* (CFPL C50) après 24h (a), 48h(b) et (c) 72h d'incubation des cellules HEp-2 infectées par le CV-B4.

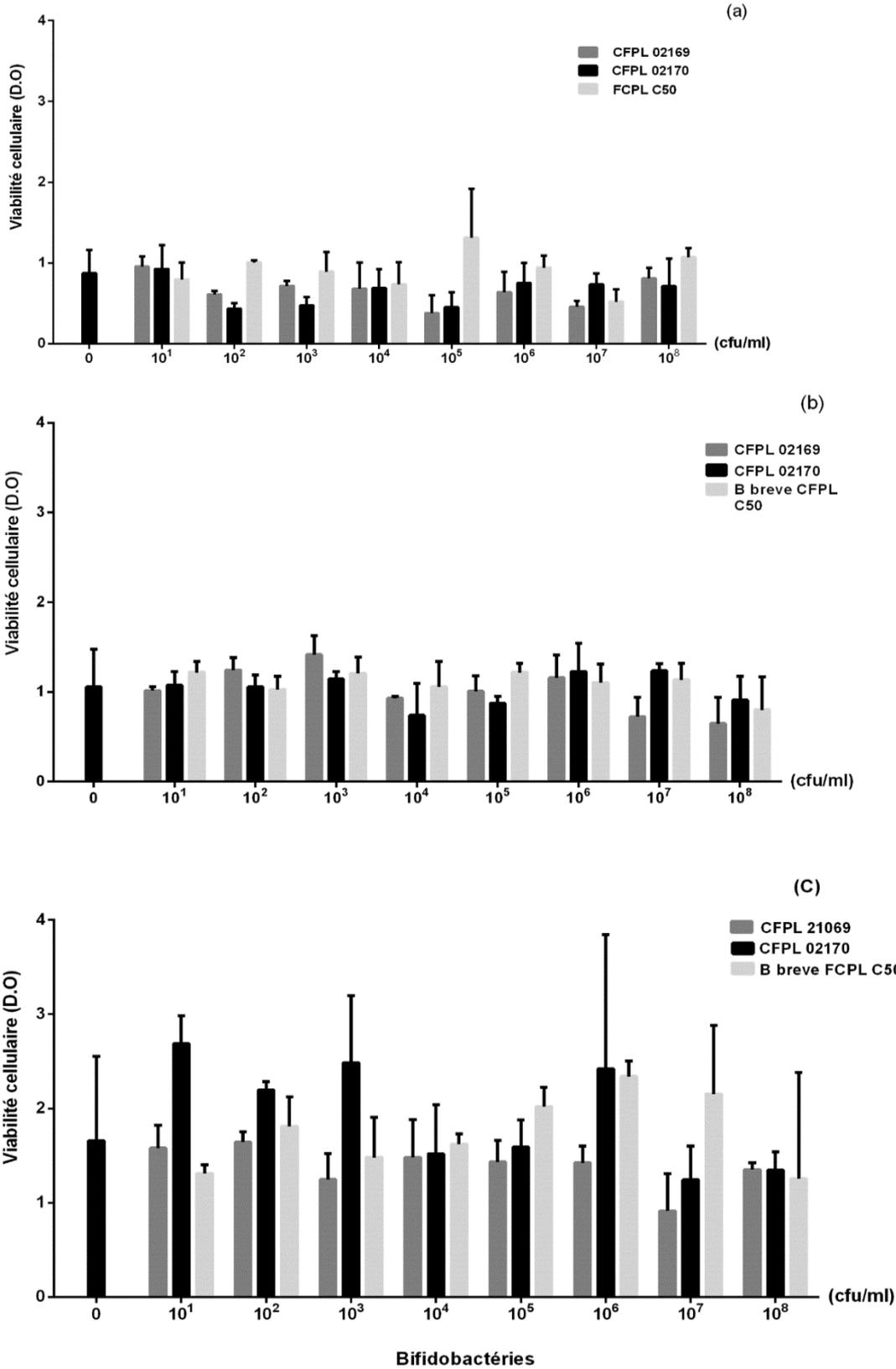


Figure 9. Viabilité cellulaire analysée par la coloration au crystal violet après 24h (a), 48h(b) et (c) 72h d'incubation en présence de doses croissantes de *B. longum* CBI0703 (souche cultivée 18h ou 72h). *comparaison à la viabilité cellulaire des cellules témoins (non traitées : 0), $p < 0.0002$.

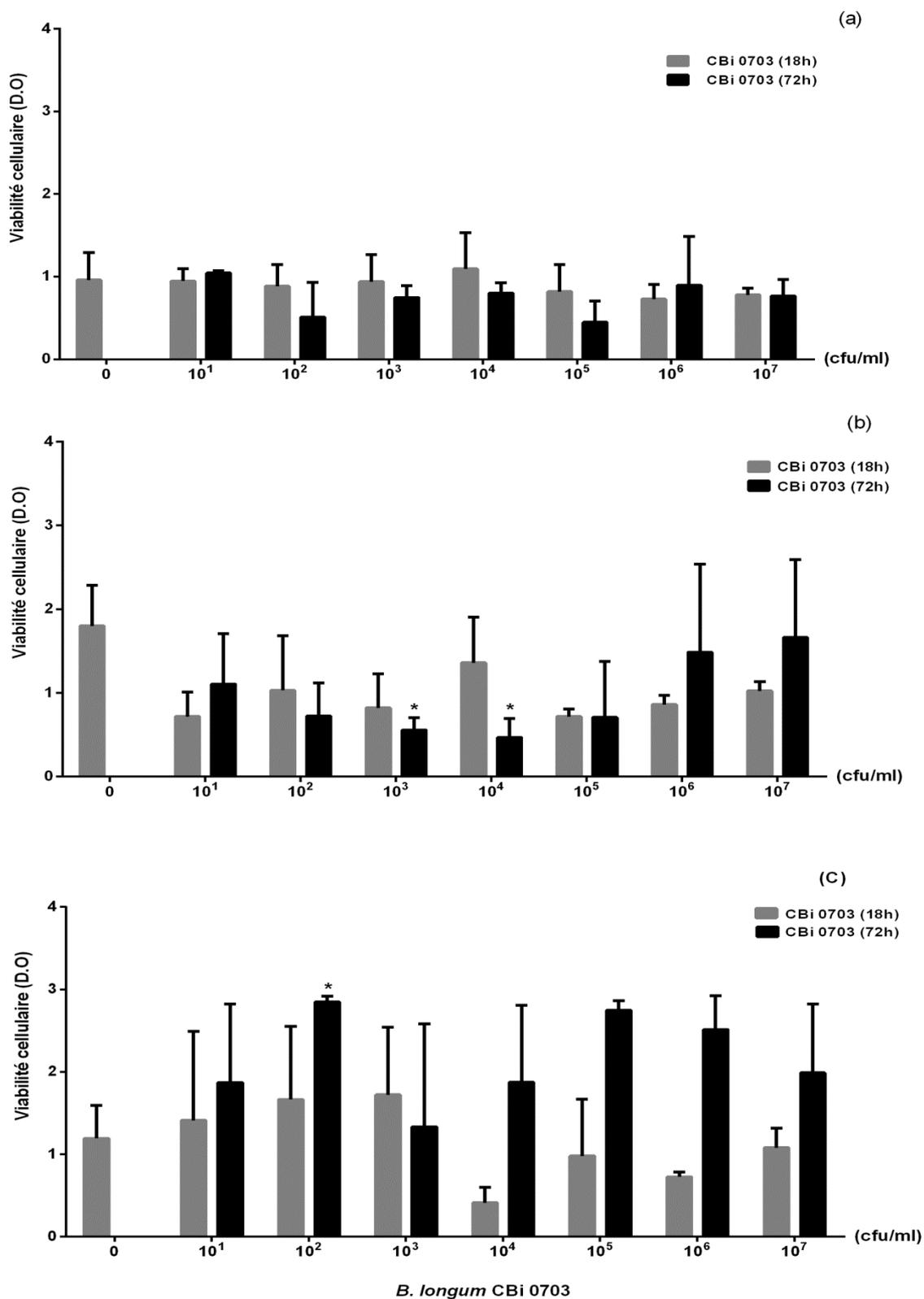
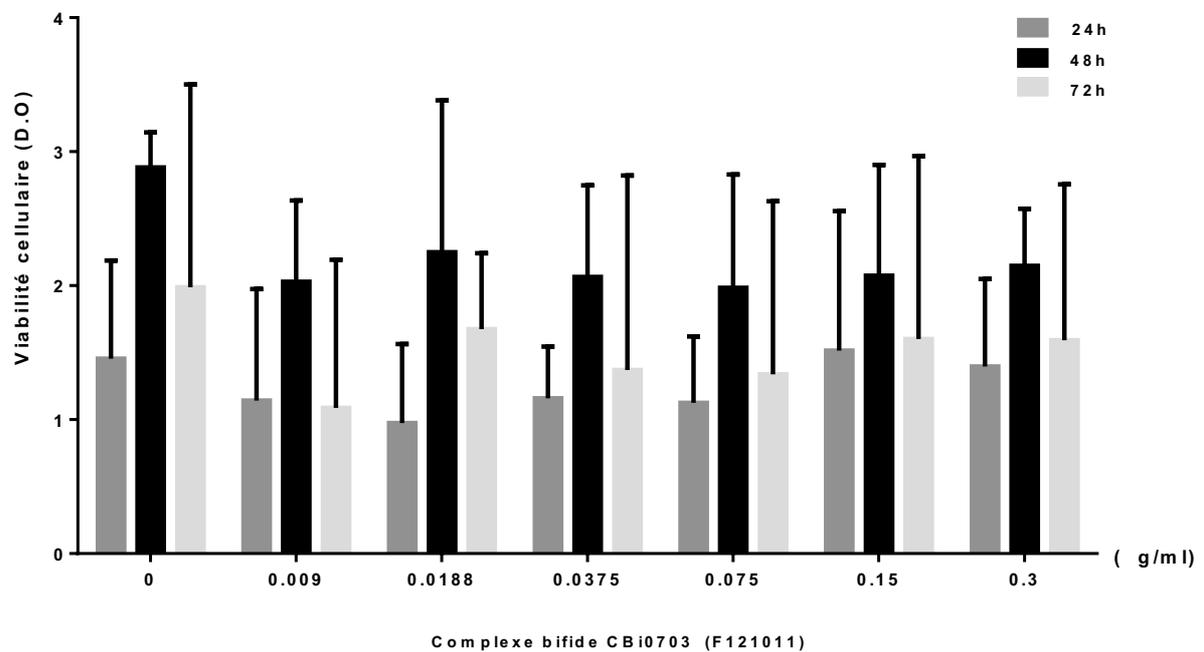


Figure 10. Viabilité cellulaire analysée par crystal violet après 24h (a), 48h(b) et (c) 72h d'incubation en présence de doses croissantes de complexes bifides de *B. longum* CBi0703 (production F121011).



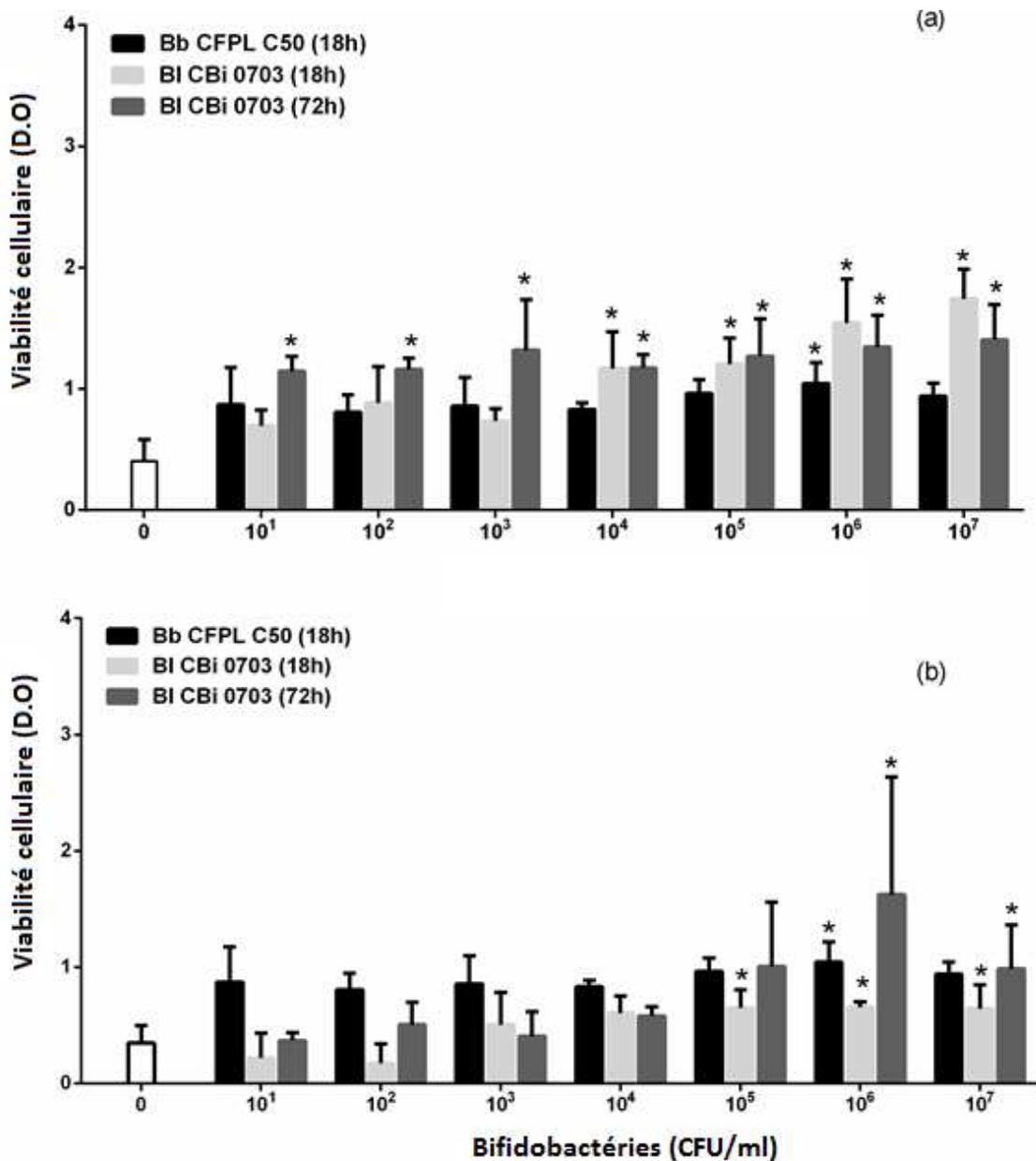
III. Protection par les bifidobactéries des cellules HEp-2 vis-à-vis de l'infection par le CV-B4 :

III.1. Incubation des bifidobactéries avec le CV-B4 avant infection des cellules HEp-2

Les souches de *Bifidobacterium longum* CFPL 02169 et 02170 n'influencent pas l'infection comme l'indique le suivi des ECP et de la viabilité cellulaire par coloration au crystal violet (données non illustrées).

Par contre, la viabilité des cellules HEp-2 inoculées avec le CV-B4 pré-incubé avec la souche de *Bifidobacterium longum* CBi0703 est supérieure à celle des cellules infectées par le virus non traité (Figure 11). L'effet protecteur le plus marquant est observé avec les bifidobactéries cultivées 72h. Vingt-quatre heures après inoculation du virus, les valeurs de DO sont supérieures aux valeurs témoins quel que soit la dose essayée, soit de 10^1 à 10^7 ufc/ml (entre 0.01 ufc/ TCID₅₀ à 10^4 ufc/TCID₅₀).

Figure 11. Viabilité cellulaire après infection par le CV-B4 pré-incubé avec *B. longum* CBi0703 ou *B. breve* CFPL C50. La viabilité cellulaire est évaluée le test de Crystal Violet 24h (a) et 48h (b) après infection. Les résultats sont exprimés en moyenne + écart-type de la DO (3 expériences). * P = 0,0001 vs 0 (pas de bifidobactéries mis en incubation avec le CV-B4). BI CBi0703 (18h): souche de *Bifidobacterium longum* CBi0703 cultivée pendant 18 heures ; BI CBi0703 (72h): souche de *B. longum* CBi0703 cultivée pendant 72 heures ; Bb CFPL C50 (18h): souche de *B. breve* CFPL C50 cultivée pendant 18 heures.



En outre, aucun effet cytopathique n'est observé lorsque le virus est traité avec la concentration la plus élevée en bifidobactéries. Quarante-huit heures après infection, seules les cellules infectées par le virus pré-traité par les doses les plus élevées montrent une viabilité encore significativement préservée, avec un ECP maintenu à 70%.

On remarque que l'effet protecteur de la viabilité cellulaire par pré-incubation du virus avec *B. longum* CBi0703 est moins intense si la souche a été cultivée pendant 18h. Il est nécessaire de mettre en contact entre 10 et 10^4 ufc/TCID₅₀ pour obtenir un effet protecteur mais qui se maintient avec moins d'intensité, l'effet cytopathique étant maximal (100%) 48h après inoculation.

Enfin, la souche de *B. breve* CFPL C50 protège la viabilité cellulaire lorsqu'elle est incubée avec le CV-B4 pour un rapport de 1000 ufc/TCID₅₀.

III.2. Incubation des bifidobactéries avec les cellules HEp-2 avant infection par le CV-B4

Aucun effet protecteur n'est observé dans le cas de pré-traitement des lits cellulaires par les souches 02169, 02170 et 02073.

La lecture au microscope des ECP bien que semi-qualitative, semble indiquer que la souche *B. longum* CBi 0703 cultivée 18h ou 72h et la souche *B. breve* CFPL C50 pourraient exercer un effet protecteur les ECP variant de 20% à 30 % respectivement. Mais la protection vis-à-vis de l'effet cytopathique ne perdure pas.

L'analyse de la viabilité cellulaire par coloration de Crystal violet ne confirme pas 24h post-incubation d'effet protecteur (Figure 12), alors que la pré-incubation des virus avec la souche CBi0703 cultivée 72h prévient la perte de viabilité cellulaire induite par le virus non pré-traité.

Conclusion

L'incubation des cellules avec des bifidobactéries ne les protègent pas de l'infection par CV-B4.

IV. Protection par les complexes bifides des cellules HEp-2 vis-à-vis de l'infection par le CV-B4.

IV.1. Incubation des complexes bifides avec le CV-B4 avant infection des cellules HEp-2

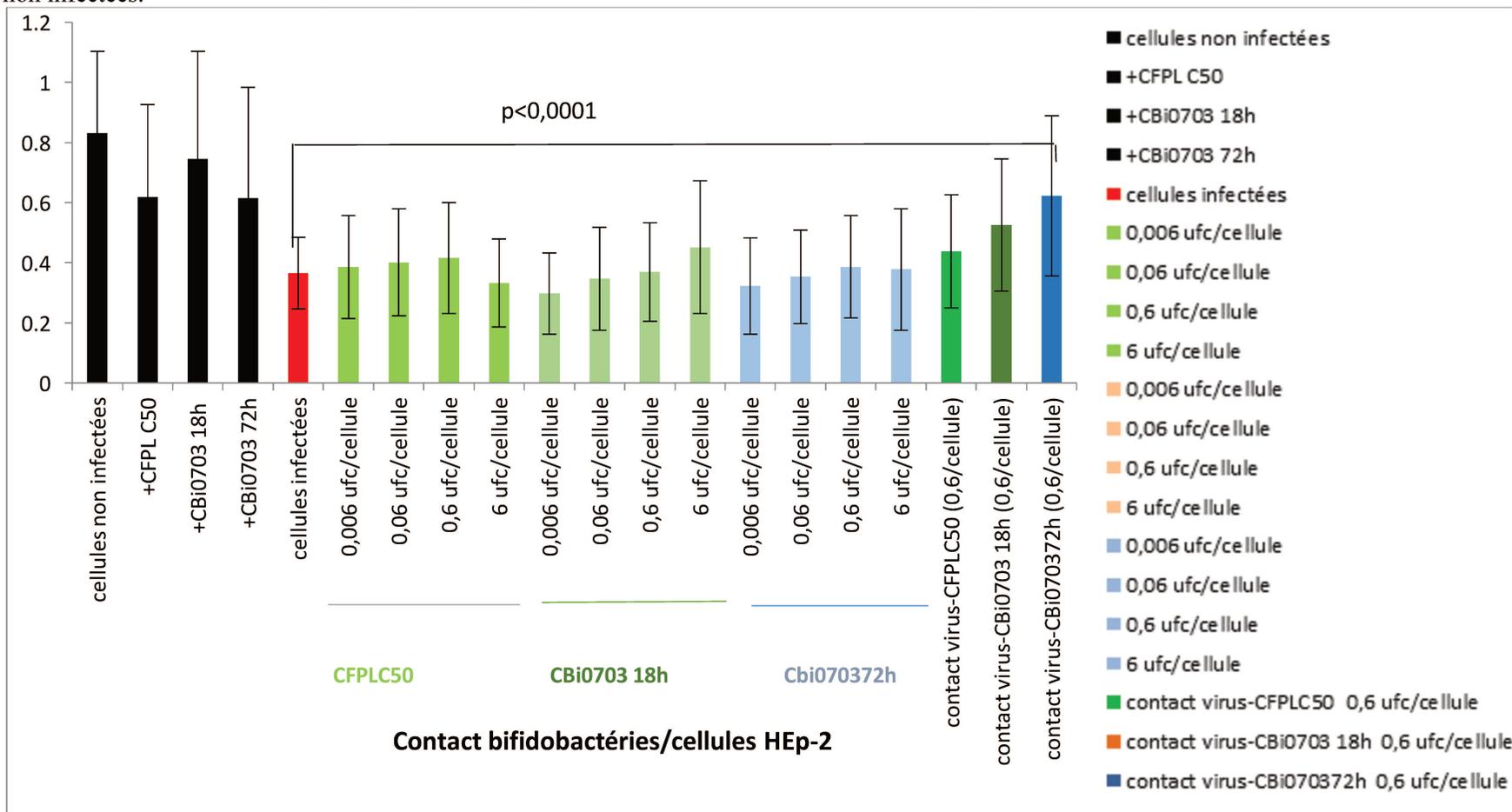
La lecture au microscope des ECP montre une protection exercée par le complexe bifide issu de la première production F121011. L'ECP n'est que de 0-10% à 48h lorsque le virus a été incubé avec des concentrations comprises entre 0.0188 et 0.15 µg/ml, mais cet effet protecteur vis-à-vis de l'infection par le Coxsackievirus B4 ne perdure pas après 72h d'incubation (Figure 13a).

De même, le complexe bifide issu de la production F140911 montre une protection comme l'indique la lecture des ECP après 48h d'incubation mais cette protection disparaît à 72h d'incubation (Figure 14a). Par contre, le complexe *B. breve* CFPL C50 n'induit pas de protection vis-à-vis de l'effet cytopathique après 48 et 72h d'incubation (Figure 15a).

L'analyse de la viabilité cellulaire par coloration au Crystal violet confirme à 24h et 48h d'incubation l'effet protecteur induit par les complexes bifides issus de la production F121011 (Figure 13b). De même, l'analyse de la viabilité cellulaire par le Crystal violet après traitement du CV-B4 avec les complexes bifides issus de la production F140911, confirme l'effet protecteur de la lecture au microscope des ECP après 48h d'incubation. En outre, la coloration par le crystal violet indique que l'effet protecteur n'est pas totalement annulé à 72h d'incubation contrairement à ce que suggère la lecture des ECP (Figure 14b). Mais, comme le titrage viral des cellules infectées par le CV-B4 pré-incubé avec des doses croissantes de complexes bifides F140911, ne corrobore que les résultats des ECP, à savoir un effet anti-viral jusque 48 d'incubation des cellules HEp-2 inoculées par le virus, avec une réduction du

Figure 12. Effet de l'incubation de cellules HEp-2 avec des bifidobactéries sur la viabilité cellulaire 24h après infection par le CV-B4

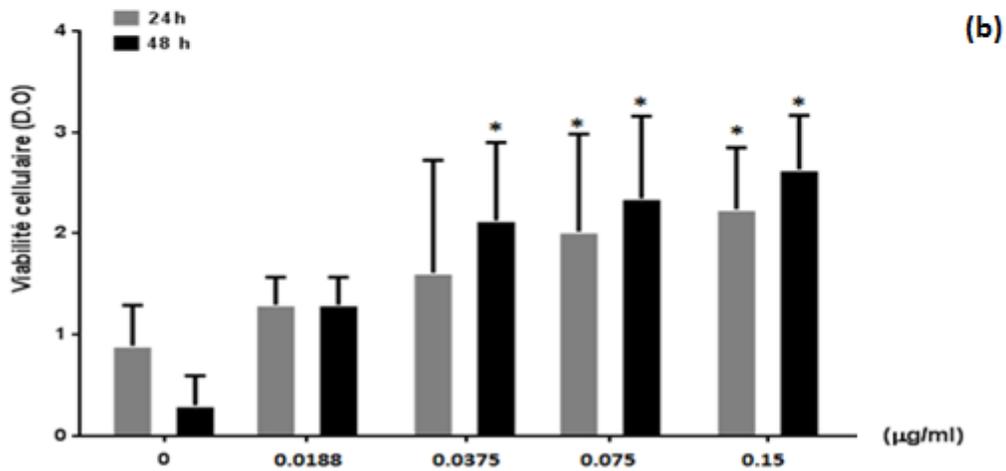
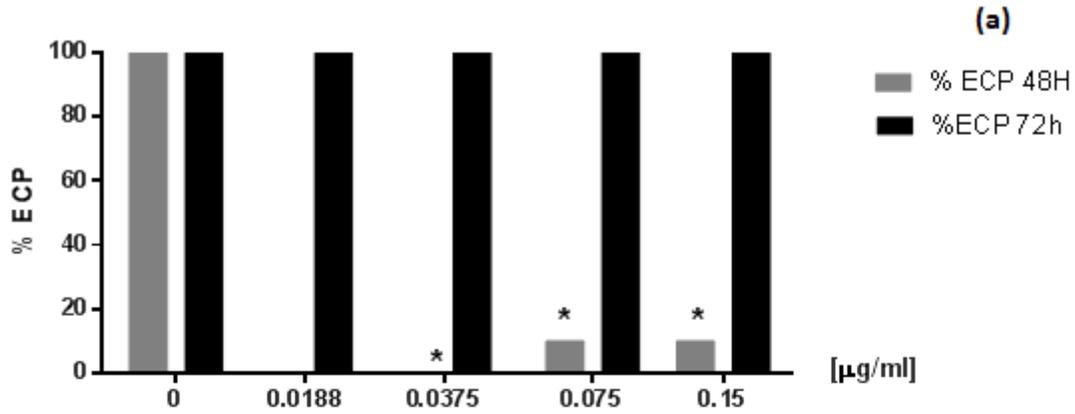
La viabilité cellulaire est évaluée par le Crystal violet. Les résultats sont exprimés en moyenne de DO+ écart-type (3 expériences). P= 0.0001 vs 0 (cellules HEp-2 non prétraitées avant infection par le CV-B4). BI CBI0703 (18h): souche de *Bifidobacterium longum* CBI0703 cultivée pendant 18 heures ; BI CBI0703 (72h): souche de *B. longum* CBI0703 cultivée pendant 72 heures ; Bb CFPL C50 (18h): souche de *B. breve* CFPL C50 cultivée pendant 18 heures. Cellules infectées : cellules HEp-2+CV-B4 ; ufc/cellule : nombre de colonies par cellules ; cellule non infectées : cellule HEp-2 saine ; Contact virus-CFPLC50/CBI0703 : nombre de colonies bactérienne incubé avec le virus ; +CFPL C50, +CBI0703 18h/72h : bifidobactéries incubées avec les cellules HEp-2 non infectées.



titre viral d'au moins $4 \log_{10}$ TCID₅₀/ml par rapport aux titres des lits cellulaires infectés par les virus non traités par les complexes (Figure 15), on peut conclure que la protection ne dépasse pas 48h. Plus spécifiquement, la cinétique de multiplication virale montre que le titre de CV-B4 non traité augmente d'environ $4 \log_{10}$ TCID₅₀ en 24h d'incubation alors que le titre est stable voire diminue si le CV-B4 est traité par le complexe bifide F140911. Après 48h d'incubation, l'augmentation du titre de CV-B4 non traité est de l'ordre de $6 \log_{10}$ TCID₅₀ alors qu'il ne dépasse pas $2,3 \log_{10}$ TCID₅₀ avec la dose la plus élevée de complexe bifide F140911, soit environ 1,6 ng/TCID₅₀. La dose la plus efficace 0,00625µg/ml, soit 6,25pg/TCID₅₀ empêche une augmentation supérieure à $0,5 \log_{10}$ TCID₅₀ (Figure 8a). Par contre, une incubation plus longue lève l'inhibition antivirale, l'augmentation des titres viraux étant de l'ordre de $7 \log_{10}$ quel que soit le traitement après 72h d'incubation.

Dans le cas du complexe bifide issu de la souche *B. breve* CFPL C50, l'absence de protection observée par lecture des ECP n'est pas corroborée par le test de viabilité cellulaire, ni le titrage viral (Figures 15b, 16b). On observe une résistance cellulaire par coloration au crystal violet pour les cellules HEP-2 infectées avec du CV-B4 incubé avec des doses de complexe bifide CFPL C50 comprises entre 0,00625 et 0,4µg/ml, soit entre 6,25pg/TCID₅₀ et 0,4ng/TCID₅₀. De même le titrage viral montre que l'augmentation du titre viral est moindre à 24 et 48h d'incubation lorsque le CV-B4 est incubé en présence du complexe bifide avant inoculation aux cellules HEP-2. On remarque cependant que l'inhibition est moins efficace que lorsque le CV-B4 est incubé en présence de complexe bifide *B. longum* CBi0703. Ainsi, l'augmentation du titre viral 24h après inoculation de CV-B4 incubé en présence de complexe bifide de *B. breve* CFPL C50 peut atteindre $1 \log_{10}$ TCID (dose 0,05µg/ml, soit à 0,05ng/TCID₅₀). Après 48h d'incubation, l'augmentation du titre viral reste contraint entre 0.9 et 2.7 \log_{10} TCID₅₀, soit une tolérance légèrement plus élevée qu'avec le complexe de *B. longum*.

Figure 13. Effet cytopathique du virus CV-B4 incubé en présence de doses croissantes de complexes bifides CBi0703 (production F121011) et viabilité cellulaire des cellules HEp-2 par coloration au crystal violet. * P = 0,0001 vs 0 (pas de bifidobactéries mis en incubation avec le CV-B4).



F121011

Figure 14. (a) Effet cytopathique du virus CV-B4 incubé en présence de doses croissantes de complexes bifides CBI0703 (production F140911) et (b) viabilité cellulaire.* P = 0,0001 vs 0 (CV-B4 incubé avec le milieu seul).

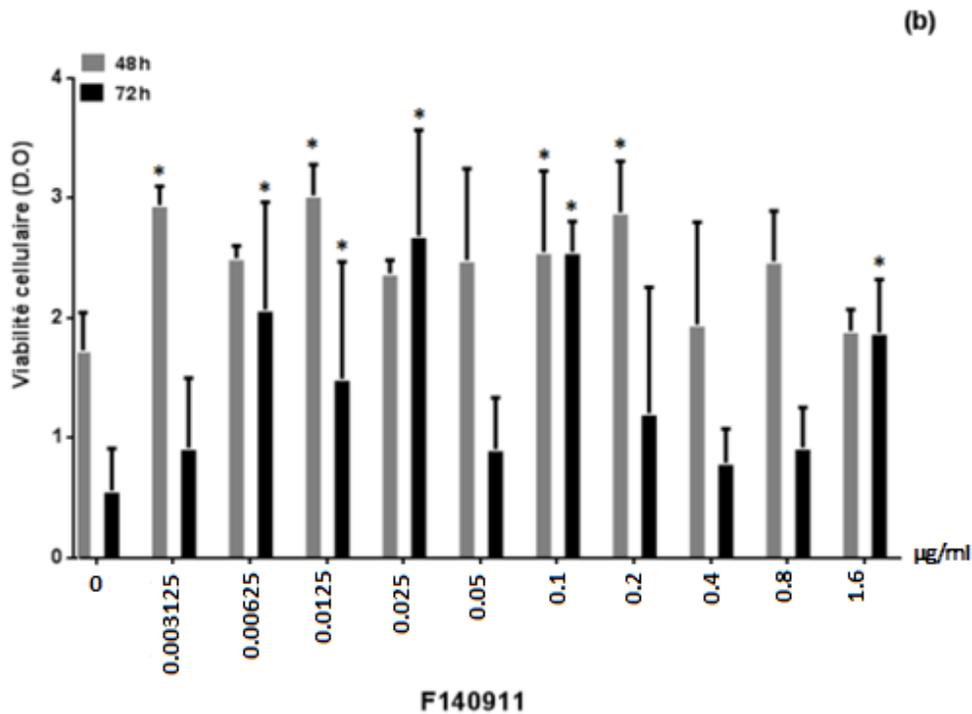
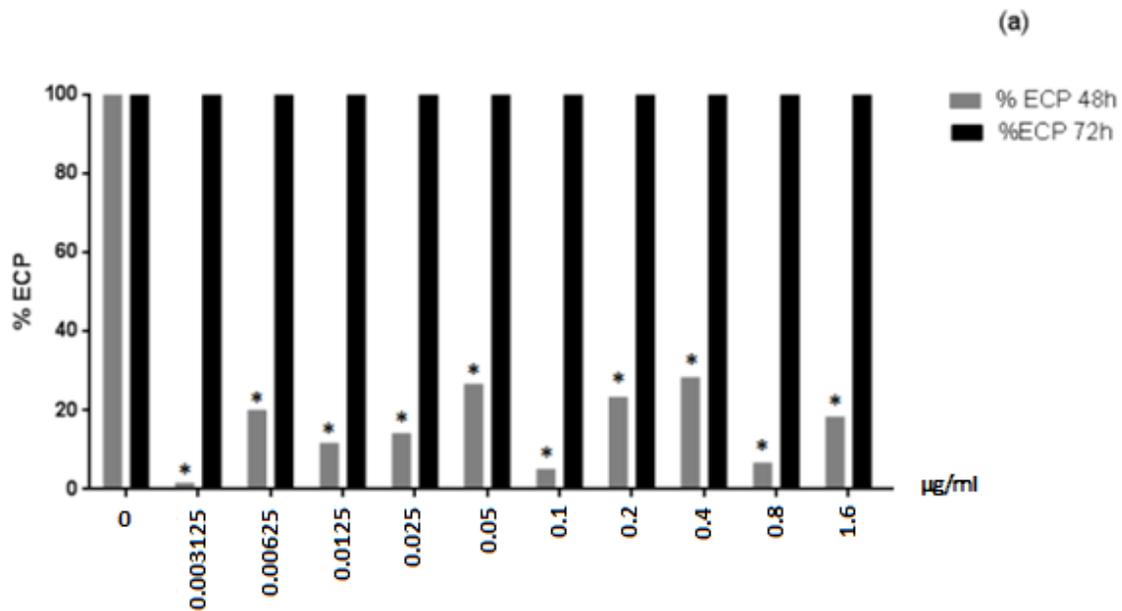


Figure 15. (a) Effet cytopathique du virus CV-B4 incubé en présence de doses croissantes de complexes bifides *B. breve* CFPL C50 et (b) viabilité cellulaire à 48 et 72h post-incubation.* P = 0,0001 vs 0 (CV-B4 incubé avec le milieu de culture).

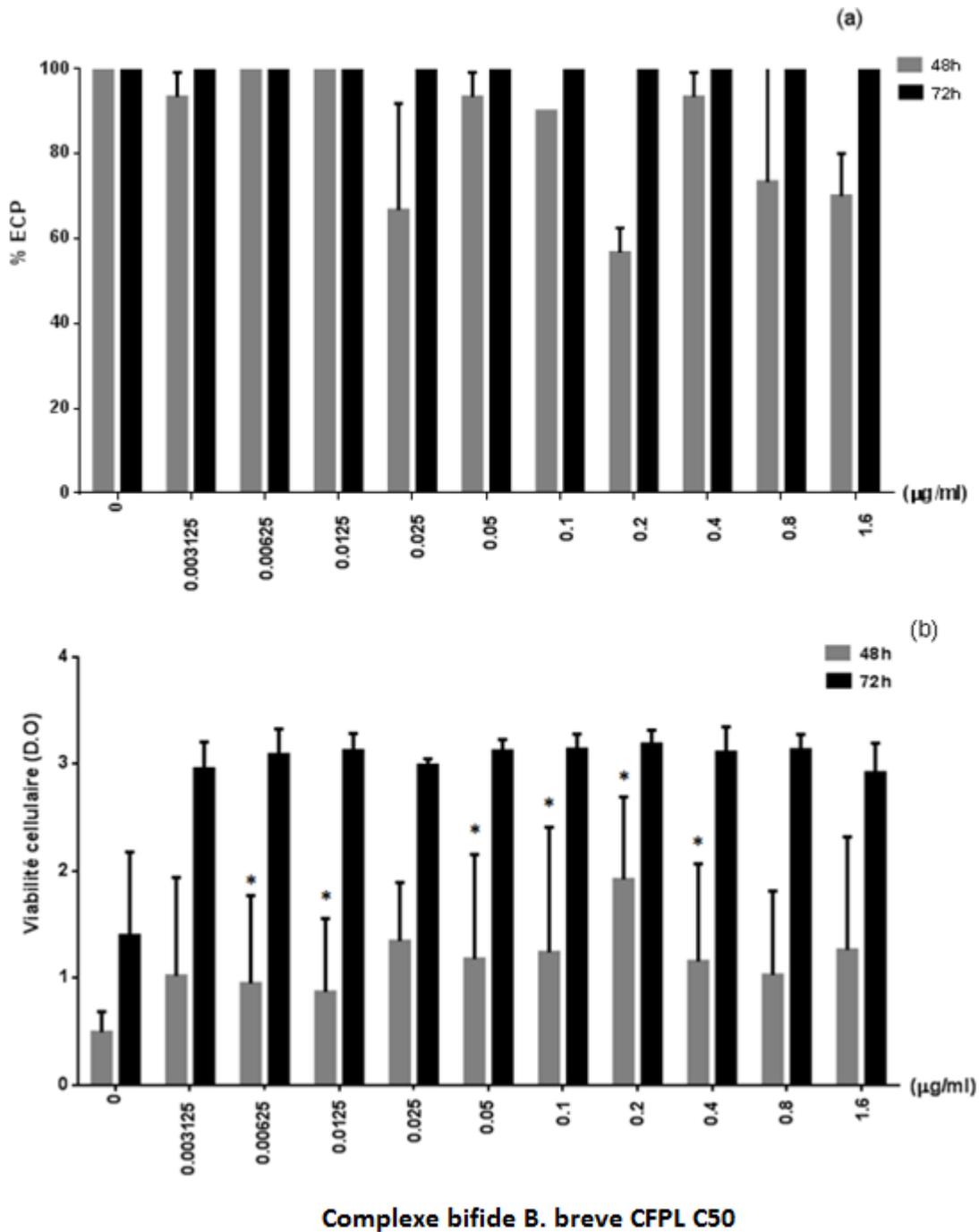
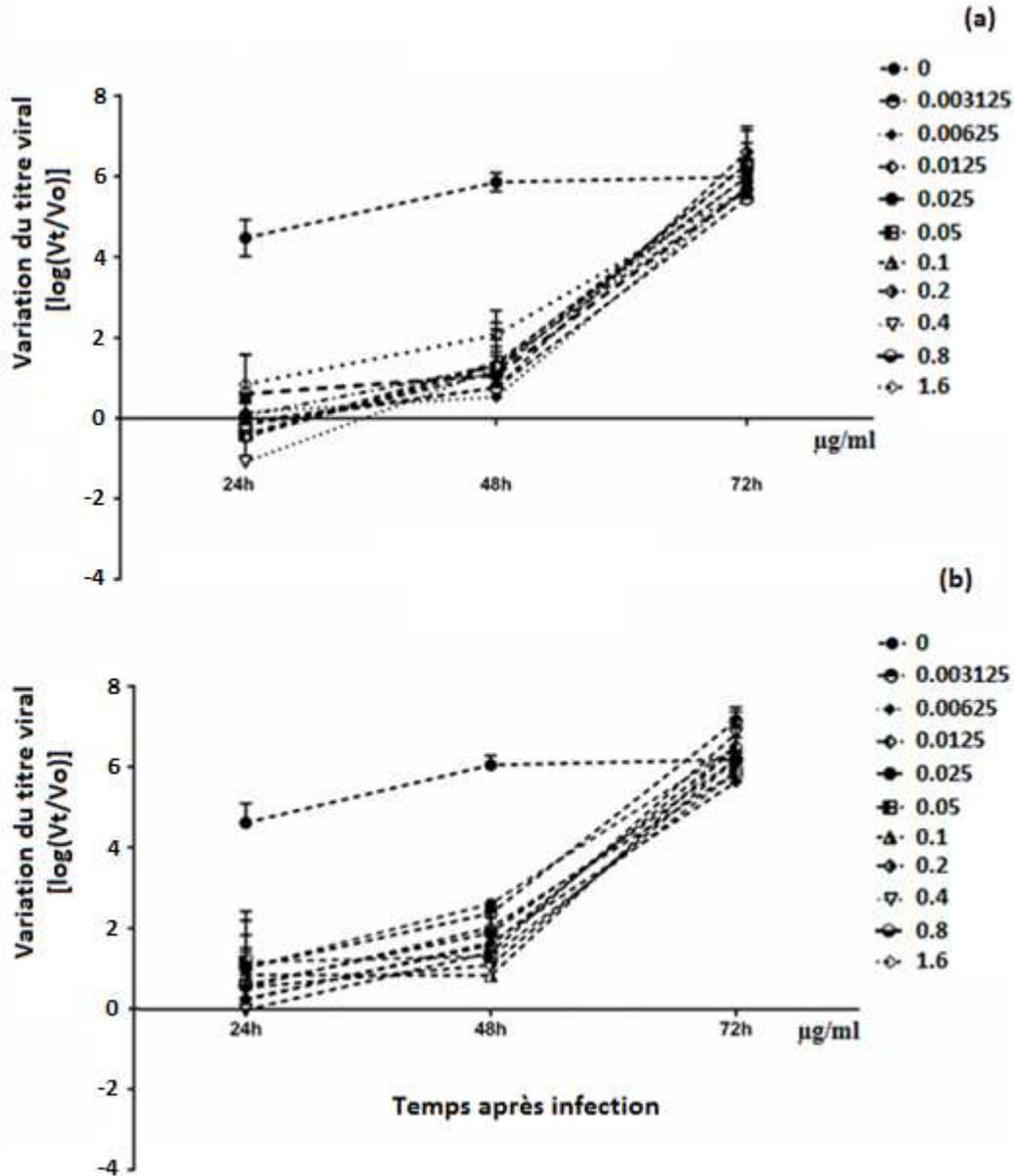


Figure 16. Titrage viral des cellules infectées par le CV-B4 incubé avec des doses croissantes de complexes bifides après 24; 48 et 72 d'incubation (3 expériences). **(a)** Complexe bifide *B. longum* CBi0703, **(b)** : Complexe bifide *B. breve* CFPL C50. V0: titre viral de l'inoculum (TCID₅₀/ml); Vt: titre viral (TCID₅₀/ml) du surnageant collecté 24, 48 et 72 h après inoculation. Les résultats sont exprimés en moyenne de $\log(V_t/V_0) \pm$ écart-type.



Conclusion

Les complexes bifides produits par les souches *B. longum* CBi0703 et *B. breve* CFPL C50 ont des propriétés anti-virales lorsqu'ils sont incubés avec le CV-B4 avant infection des cellules HEp-2. Les complexes *B. longum* CBi0703 semblent plus efficaces, cette différence étant à mettre en regard avec la reconnaissance ou non des TLRs. Le complexe de *B. longum* n'est pas reconnu par les TLRs2/6 contrairement au complexe de *B. breve*.

IV.2. Incubation des complexes bifides avec les cellules HEp-2 avant infection par le CV-B4

Les premiers résultats effectués dans les conditions d'un contact d'une heure des complexes bifides *B. longum* CBi0703 (productions F121011 et F141011) avec les cellules HEp-2 sans lavage avant inoculation du CV-B4 montraient une protection cellulaire aléatoire vis-à-vis de l'infection. L'hypothèse de complexes libres accessibles aux virus a été explorée. Le lavage après contact d'une heure des complexes bifides avec le lit cellulaire mais avant inoculation du CV-B4 abroge toute protection vis-à-vis de l'effet cytopathique induit par l'infection. De même, la viabilité cellulaire est effondrée quelle que soit la dose de complexe bifide testée.

Conclusion

La pré-incubation des complexes bifides *B. longum* CBi0703 avec les cellules HEp-2 n'induit pas de réponse de protection cellulaire vis-à-vis de l'infection virale.

IV.3. Traitement par les complexes bifides des cellules HEp-2 infectées par le CV-B4

Les cellules HEp-2 sont inoculées par le CV-B4 E2 (MOI de 0.004) et incubées pour une durée d'une heure à 37⁰C sous atmosphère de 5% en CO₂. Le tapis cellulaire est lavé deux fois avec le PBS. Les complexes *CBi0703* (production F141011) sont ajoutés dans chaque puits, avec des titres finaux allant de 0,003125 à 1,6 µg/ml, soit de 3,12pg/TCID₅₀ à 1,6ng/TCID₅₀. Après une

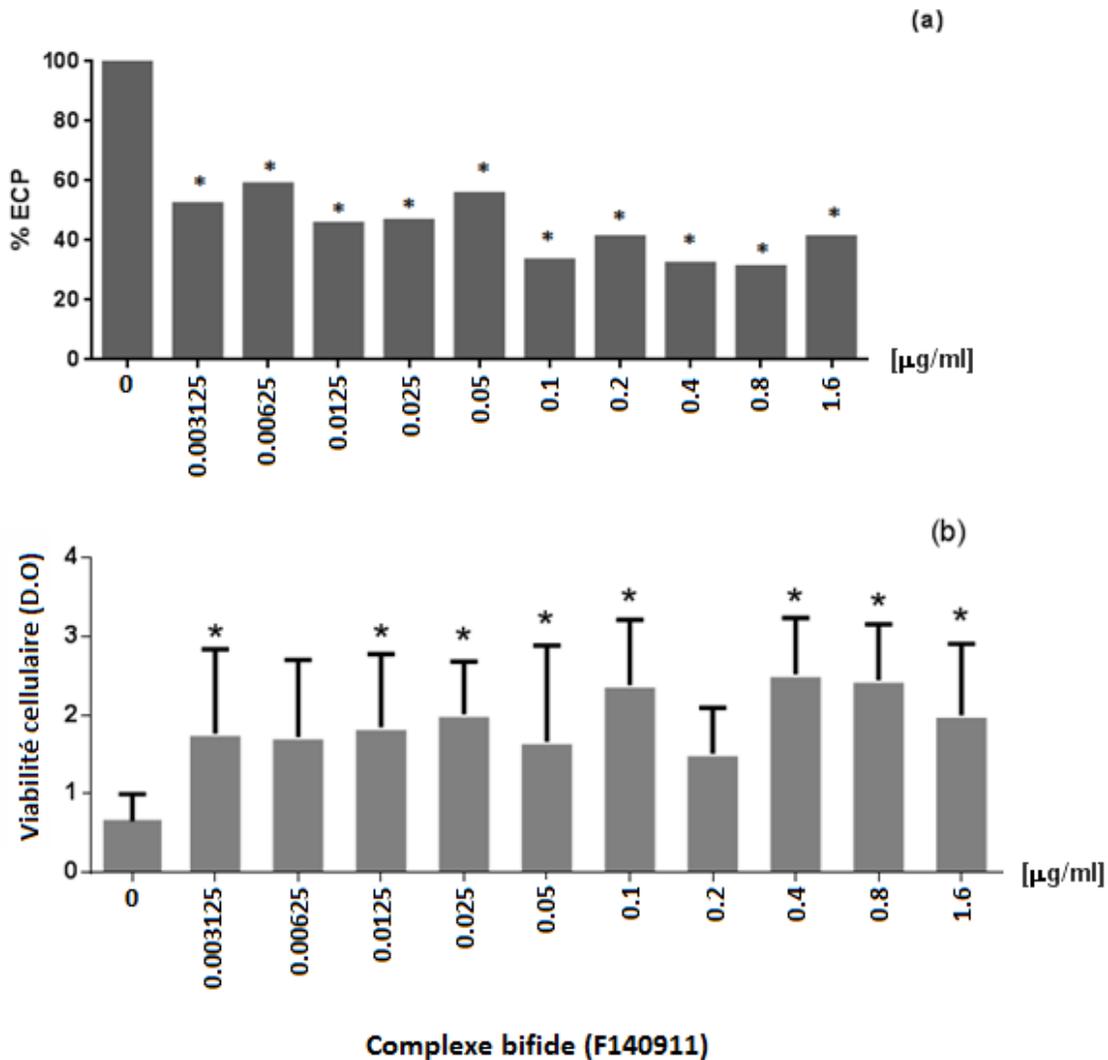
incubation de 4 heures à 37⁰C sous atmosphère de 5% en CO₂, le tapis cellulaire est lavé 2 fois avec du PBS et les mêmes doses de complexes *CBi0703* sont ajoutées aux puits correspondant. Après une incubation de 18h post-infection à 37⁰C sous atmosphère de 5% en CO₂ le protocole « lavage/addition des complexes » est répété.

L'analyse statistique montre que la supplémentation répétée du milieu des cellules infectées en complexes bifides (production F140911) entraîne une réduction d'ECP 48h post-infection quelle que soit la concentration essayée (Figure 10a). Cette protection est confirmée par le test de viabilité du Crystal violet pour les doses allant de 0.003125 à 1.6 µg/ml à l'exception des doses 0,00625 et 0,2 µg/ml, soit 6,25pg/TCID₅₀ et 0,2ng/TCID₅₀ (Figure 10b).

Conclusion

En absence de pré-traitement du virus CV-B4 ou des cellules HEP-2, il est possible de réduire l'effet cytopathique induit par l'infection et de protéger la viabilité cellulaire. Les résultats suggèrent que si l'intégrité des complexes bifides est préservée, ils peuvent protéger les cellules non encore infectées des virions libérées par les cellules infectées.

Figure 17. Effet de la supplémentation répétée du milieu en complexes bifides CBi0703 (production F140911) sur la viabilité des cellules HEp-2 après infection par le virus Coxsackie B4 (CV-B4). Les cellules HEp-2 sont inoculées avec le virus de CVB4. Au bout de 1 heure d'incubation, le lit cellulaire est lavé et des doses croissantes de complexes bifides sont ajoutés au milieu. Le remplacement des doses est assuré 4h, et 18h plus tard. L'état cellulaire est évalué 48h après l'inoculation par lecture de l'ECP et par coloration au Crystal Violet. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type et sont issus de 3 expériences indépendantes. * P = 0,0001: lits cellulaires traités par complexes bifides vs lits cellulaires non traités (0).



V. Identification des structures impliquées dans l'effet anti-CV-B des complexes bifides

V.1. Complexes bifides produits à pH régulé

Les complexes produits à pH neutre ne présentent pas les mêmes conformations que lors d'une fermentation acide. Pour vérifier si la protection antivirale persiste, les complexes bifides produits à pH régulé (production F23) sont testés par contact avec le CV-B4 pendant 1 heure à 37°C. Les complexes protègent les cellules de l'effet cytopathique du virus 24 ; 48 et 72h post-infection (Figure 18a). Cet effet protecteur s'est traduit par la réduction des ECP à 24h avec des doses allant de 0,003125 à 1,6 µg/ml. Cet effet perdure à 48h avec les mêmes doses de F23. La viabilité estimée par la coloration au Crystal violet confirme globalement les résultats (Figure 18b). Par contre l'effet protecteur ne persiste pas pour les concentrations suivantes : 2,08 ; 4,16 et 33,28 µg/ml après 72h d'incubation (Figure 18b).

La progénie mesurée une fois après 24, 48 et 72h d'incubation en présence de doses croissantes de complexes bifides produits à pH neutre (F23 native) montre, après 24h de culture, une inhibition de multiplication virale de 5 log par rapport au témoin pour des doses de complexes allant de 0,003125 à 0,4 µg/ml. A 48h, une inhibition de multiplication virale de 5 log TCID₅₀/ml est confirmée pour les doses de 0,2 et 0,4 µg/ml, soit 0,2 et 0,4ng/TCID₅₀ (Figure 19). L'inhibition de multiplication virale observée avec les autres doses est de l'ordre de 4 log TCID₅₀/ml. Enfin, l'inhibition perdure au-delà de 48h. Ainsi, après 72h de culture, la croissance reste faible pour une dose de 6,25pg/TCID₅₀ (>5log d'inhibition par rapport au titre viral du CV-B4 non traité).

Conclusion :

La lecture au microscope des ECP montre le même seuil de protection à 48h post-infection lorsque le CV-B4 est incubé avec des doses croissantes de complexes bifides produits à pH

régulé F23 et non régulé F14. Par contre cet effet disparaît avec la F14 à 72h post-infection mais persiste avec la F23 avec les doses de 0.003125 et 0.00625 µg/ml. La progénie confirme les résultats de la viabilité cellulaire mais demande à être répétée avant de conclure.

Cependant, si l'efficacité antivirale prolongée avec les composés bifides issus de la fermentation à pH régulée est confirmée, il sera nécessaire de déterminer si elle peut résulter d'une meilleure résistance des composés bifides aux protéases cellulaires libérées lorsque les cellules infectées se lysent.

Figure 18. Effet cytopathique et viabilité cellulaire après inoculation de CV-B4 pré-incubé avec des complexes bifides produits à pH neutre (F23). L'effet cytopathique et la viabilité cellulaire sont évalués après 24 ; 48h et 72h d'incubation des cellules infectées. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne de DO+SD (n= 3 expériences). P= 0.0001 vs 0 (cellules infectées par le virus non pré-traité).

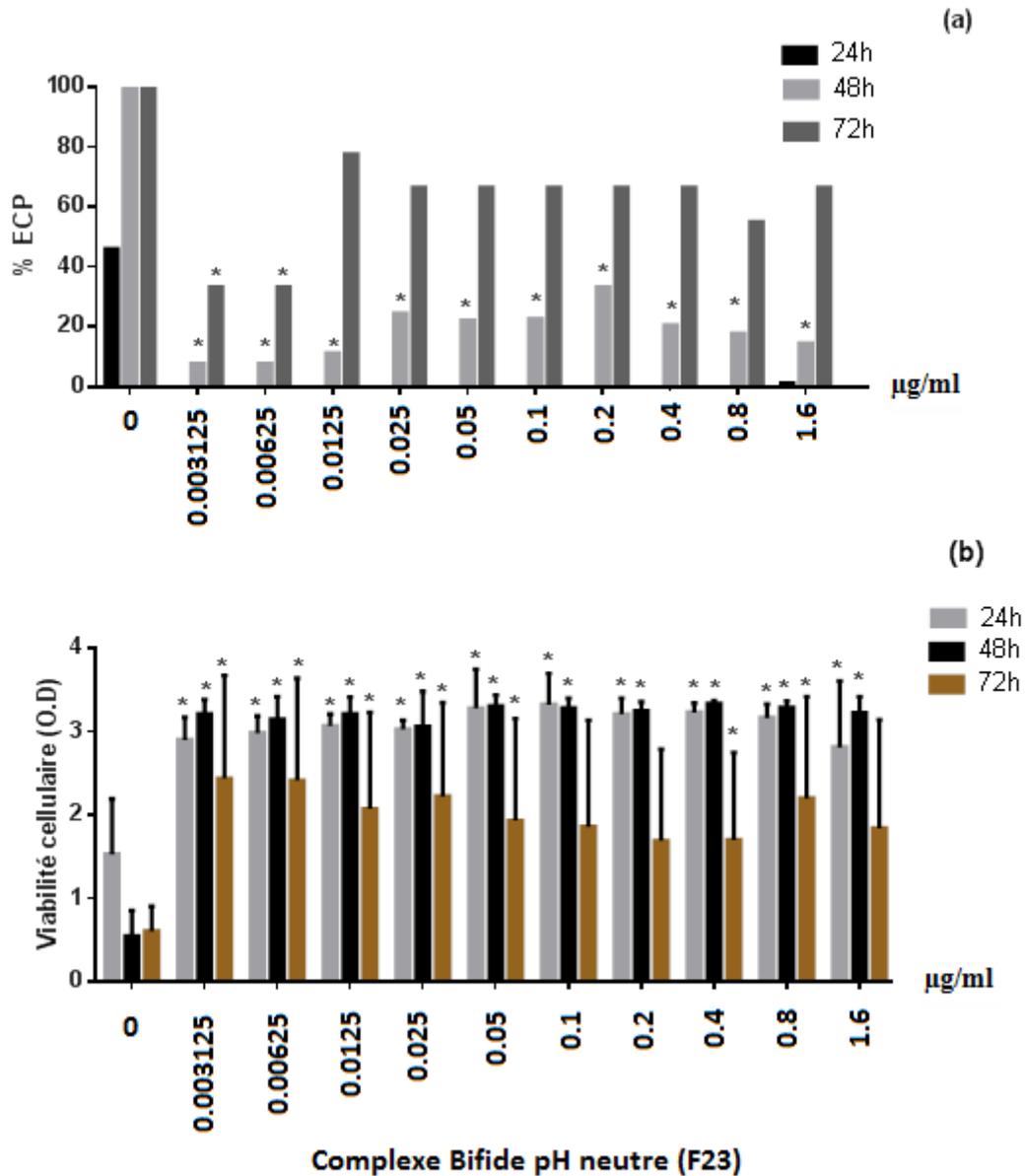
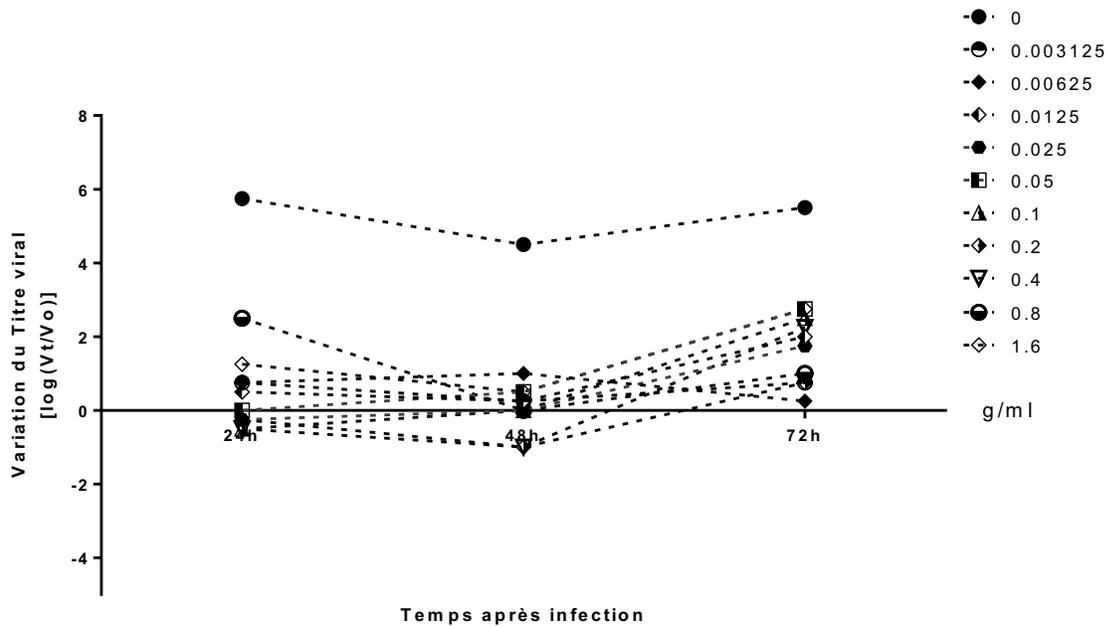


Figure 19. Progénie virale mesurée à partir des surnageants de culture de cellules infectées par le CV-B4 pré- incubé avant inoculation avec des doses croissantes de complexes bifides (F23) produits à pH neutre. Le titrage est effectué 24 ; 48 et 72h après du virus (4 expériences) V0: titre viral (log TCID₅₀ / ml) de l'inoculum; Vt: titre viral (TCID₅₀ / ml) du surnageant recueilli à 24, 48 et 72 h d'incubation. Les résultats sont exprimés en moyenne Ln (Vt / V0) ± SD.



V.2. Produits de dégradation des complexes bifides par traitement thermique en conditions acides

Les produits de dégradation des complexes bifides produits soit à pH non contrôlé (F14), soit à pH contrôlé (F23) sont obtenus après traitement acide 15 Min à 100°C. Ils sont testés pour leur efficacité protectrice par incubation virus/complexes bifides avant infection. L'effet protecteur de la vitalité cellulaire est conservé après dégradation partielle des complexes bifides F14. Les résultats montrent un niveau significativement faible d'ECP 48h après infection des cellules HEp-2 (Figure 20a). La coloration des cellules par le Crystal violet confirme l'effet protecteur. Toutes les concentrations sont efficaces à l'exception de 0.1 et 0.2 µg/ml (Figure 20b). Cet effet ne perdure pas après 72h d'incubation (Figure 20a, b).

Dans le cas de la F23Cr15Min, les ECP observés à 48h sont moins marqués avec l'ensemble des doses testées à l'exception de 0.1 et 0.2 µg/ml (Figure 21a), tandis que la protection de la viabilité cellulaire mise en évidence par le Crystal violet est efficace avec toutes les doses sauf 0.05 et 0.1 µg/ml à 48h (Figure 21b).

Figure 20. Effet du traitement acide à chaud sur l'efficacité protectrice des complexes bifides. La viabilité cellulaire à 24 ; 48h et 72h avec des concentrations croissantes de F14Cr15Min, est évaluée par le Crystal violet. Les résultats sont exprimés comme moyenne de DO+SD (n= 2 expériences). P= 0.0001 vs 0 (HEp-2+CV-B4).

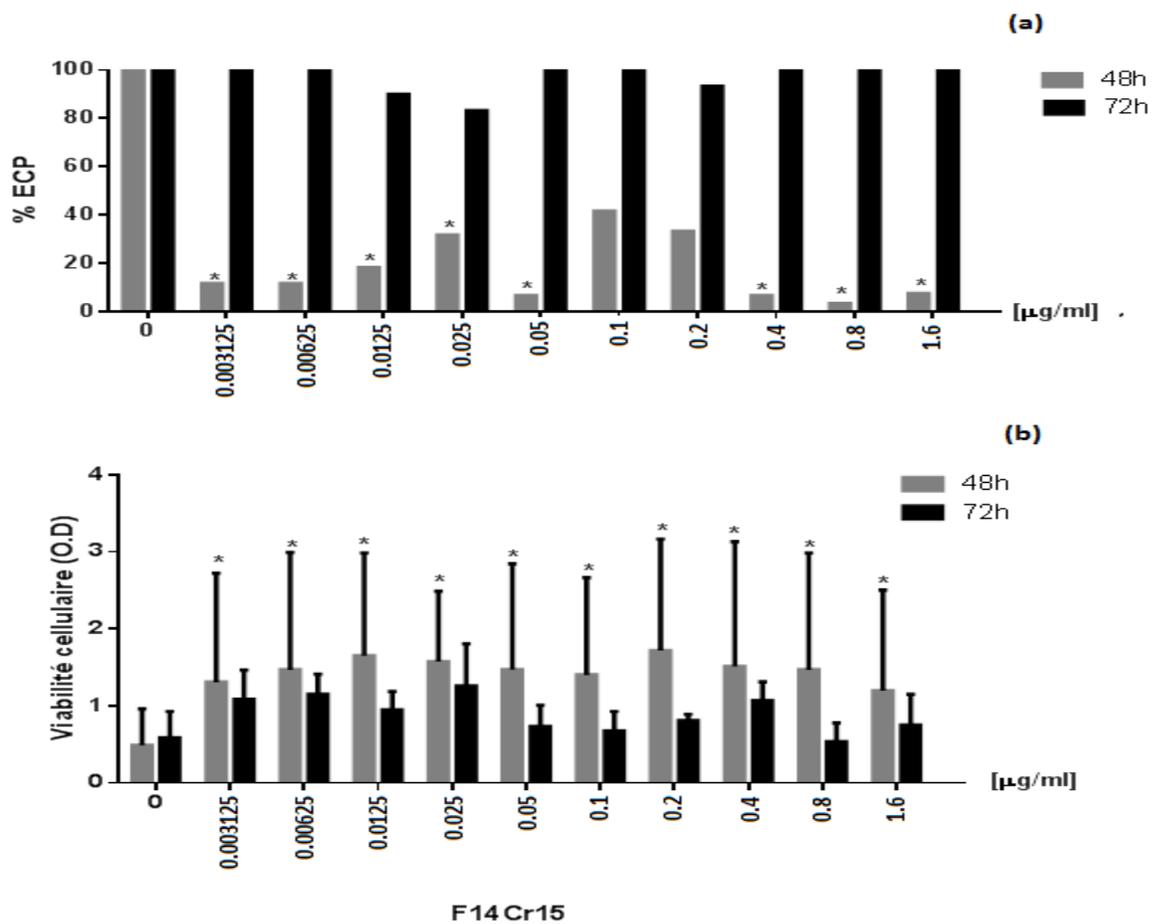
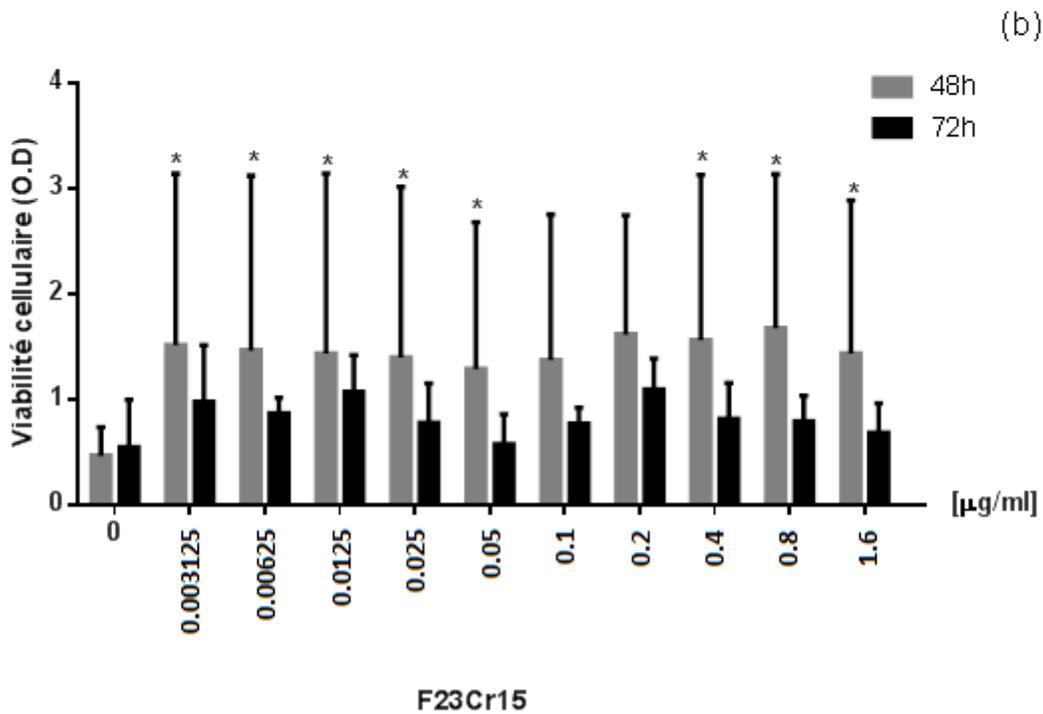
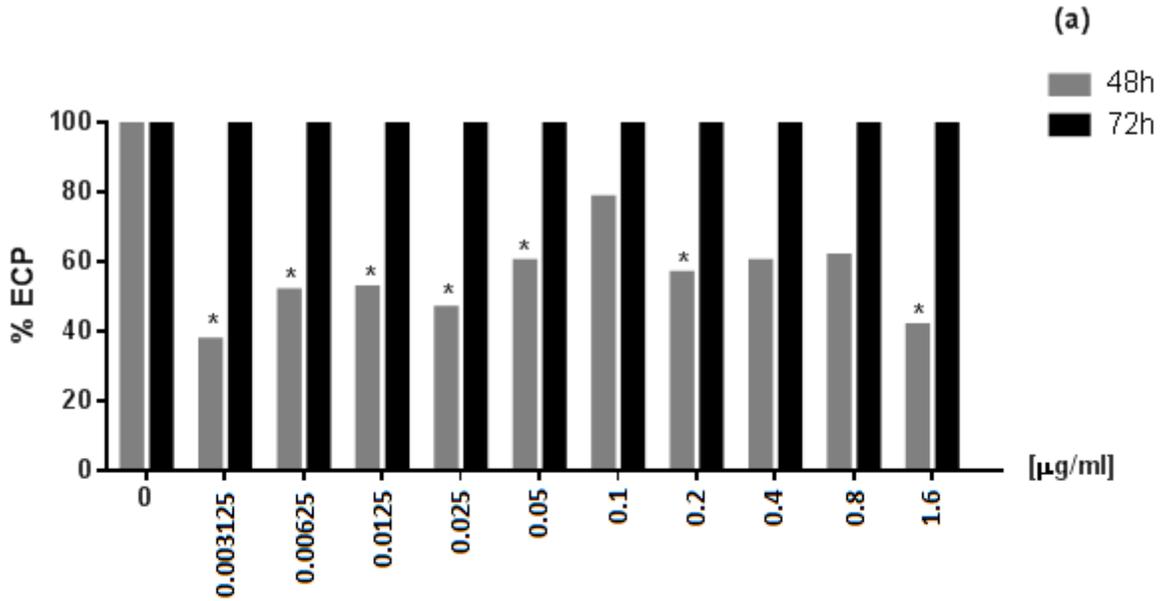


Figure 21. Effet du traitement acide à chaud sur l'efficacité protectrice des complexes bifides. La viabilité cellulaire à 48h et 72h avec des concentrations croissantes de F23Cr15Min, a été évaluée par le Crystal violet. Les résultats sont exprimés comme moyenne de DO+SD (n= 2 expériences). P= 0.0001 vs 0 (HEp-2+CV-B4).



Conclusion :

La dégradation partielle par chauffage en milieu acide n'empêche pas les complexes bifides résiduels de protéger la viabilité cellulaire.

V.3. Protéine recombinante

Dans le but de déterminer si l'efficacité des complexes macromoléculaires est due à la partie protéique, la séquence protéique de la lipoprotéine constitutive des complexes bifides, déletée de son peptide signal, est incubée avec le CV-B4 avant infection des cellules HEp-2. Les résultats montrent une protection des cellules HEp-2 vis-à-vis des effets cytopathique du CvB4 à 48h (Figure 22). La viabilité cellulaire est également préservée (Figure 23a). La multiplication virale est plus faible de de 4 log₁₀ TCID₅₀ /ml 24 et 48h après inoculation quelle que soit la dose essayée (Figure 23b).

Figure 22. Effet cytopathique de la Pré-incubation de la Protéine recombinante avec le CV-B4 24h et 48h post-infection. Les résultats sont exprimés comme moyen de DO+SD (n= 3 expériences). * P = 0,0001 par rapport à 0 (pas rPr incubé avec incubation avant CV-B4), P= 0.0001 vs 0 (HEp-2+CV-B4). F140911. 0 (pas rPr incubé avec les cellules).

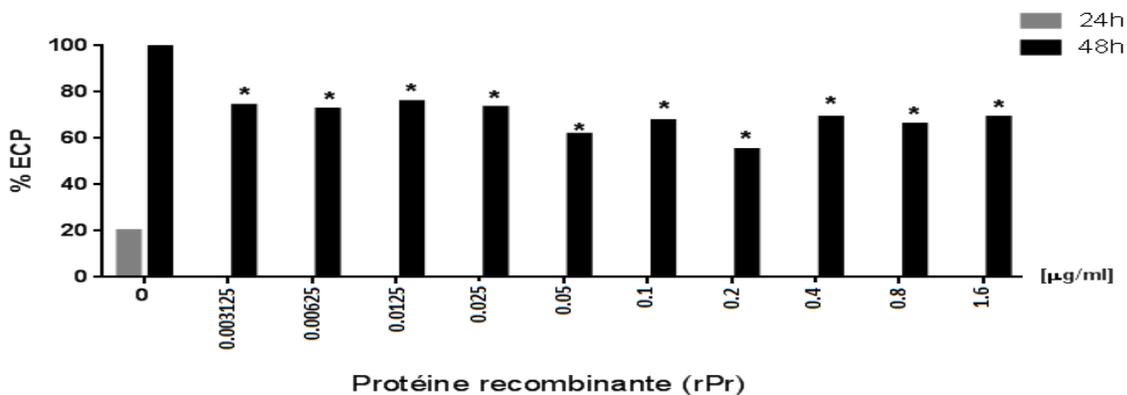
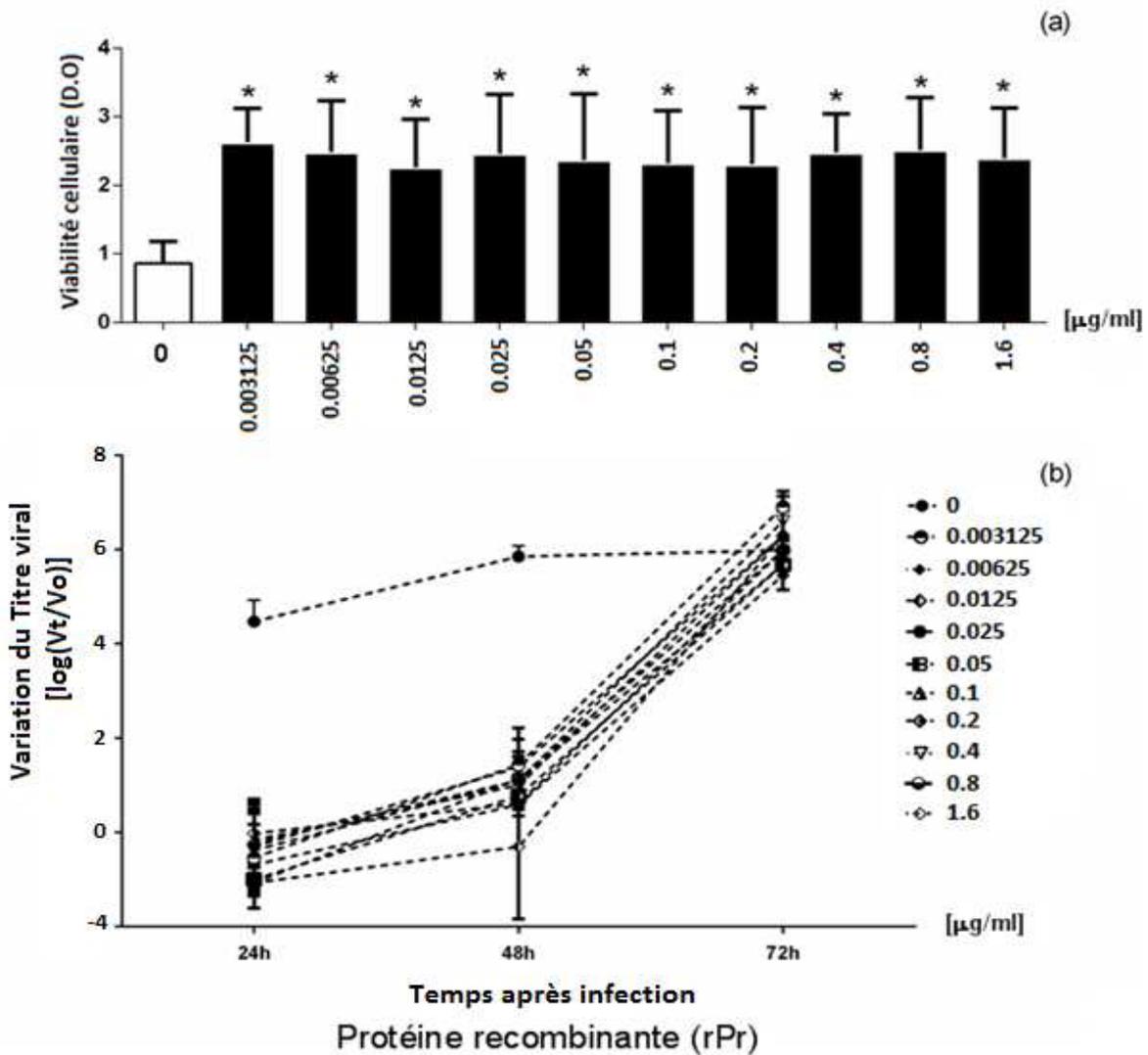


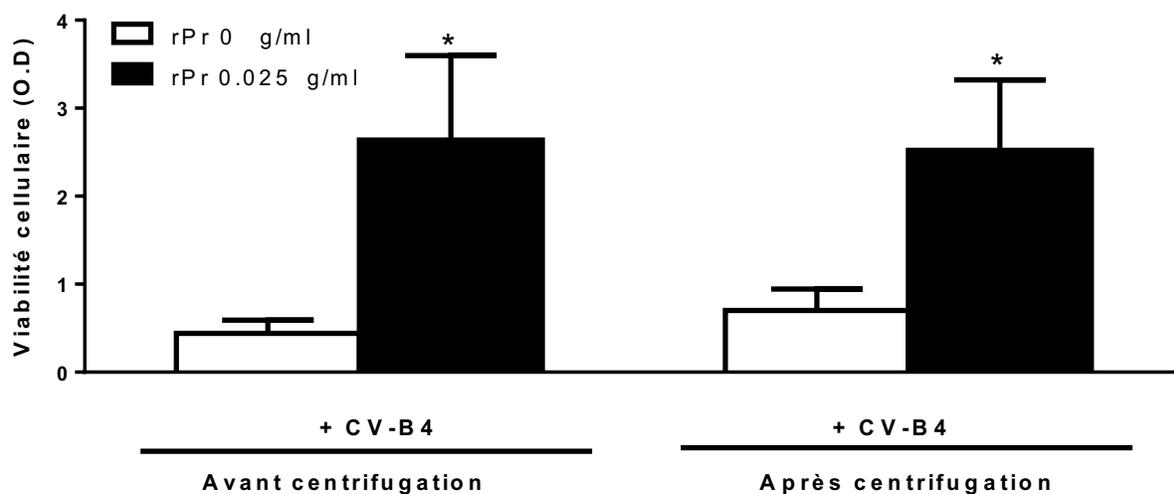
Figure 23. Incubation de la Protéine recombinante de *B. longum* avec CV-B4 E2 empêche HEP-2 infection des cellules. (a) CV-B4 E2 incubées avec des doses croissantes rPr pendant 1 heure à 37 ° C, on a inoculé aux cellules HEP-2 aux cultures et à la viabilité des cellules a été évaluée en utilisant le test Cristal Violet à 48 heures post-infection (moyenne de la DO + écart-type) (4 expériences). * P = 0,0001 par rapport à 0 (pas rPr incubé avec incubation avant CV-B4), (b) Variation du rendement du virus après une infection par CV-B4 incubées avec des doses croissantes de rPr (moyenne $\ln(V_t / V_0) \pm SD$).



V.4 Évaluation de la liaison CVB4-BI rPr après application de force centrifuge

Pour tester l'interaction entre les CV-B4 E2 et de la protéine recombinante, le CV-B4 incubé avec une dose antivirale de la protéine recombinante est soumis à une force centrifuge de 3500g et collecté à l'aide d'un dispositif d'ultrafiltration dont la membrane a un seuil de coupure de 1000 kDa. La phase supérieure (retentât) contenant CV-B4 est inoculée à des cultures de cellules HEp-2. La protection de viabilité cellulaire à la dose anti-virale BI rPr est contrôlée avant la centrifugation. La viabilité cellulaire est protégée quel que soit le traitement appliqué (Figure 24). La force centrifuge est donc insuffisante pour séparer les virons de la protéine virale.

Figure 24. Évaluation de la liaison CVB4-BI/rPr 48 heures après l'infection. La fixation de la protéine à la capsid virale est analysée en appliquant une force centrifuge de 3500 x g à la suspension virale pré-incubée avec 0,52 nm rPr ou avec le tampon (0) avant l'inoculation. La viabilité cellulaire est évaluée par coloration au cristal violet 48h après inoculation des suspensions virales (MOI 0,004) soumises ou non à une centrifugation. Les résultats sont exprimés comme moyenne des DO+SD (n= 3 expériences). * P = 0,0001. rPr: protéine recombinante.

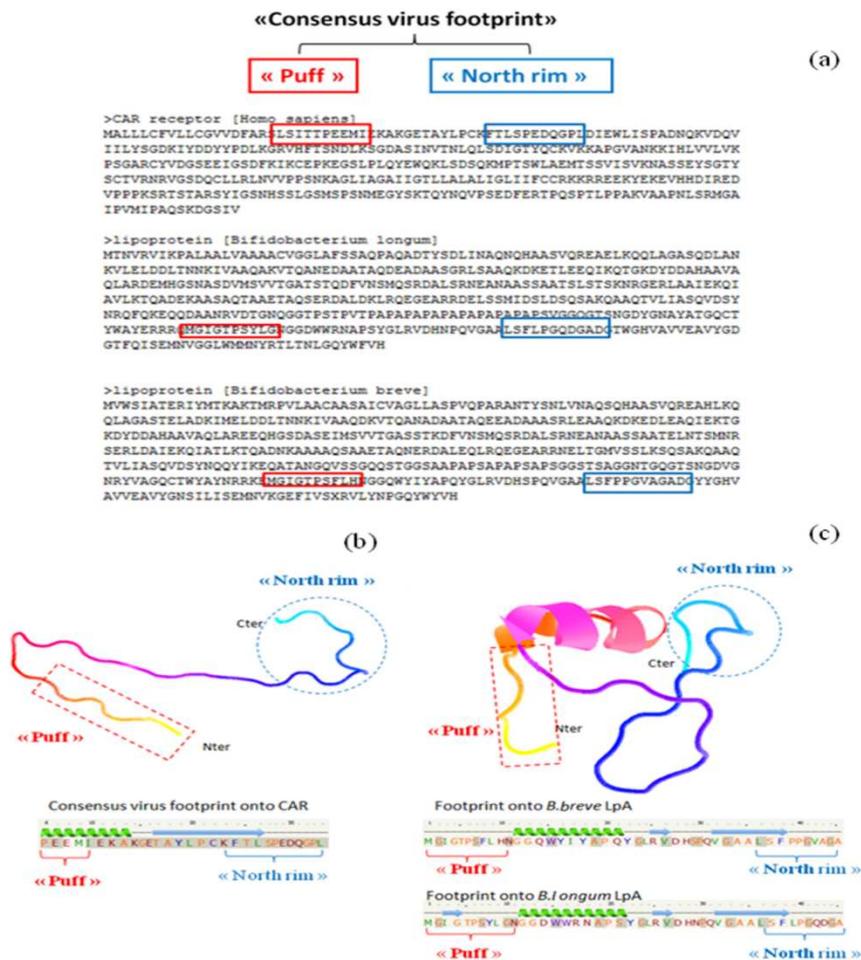


VI. Analyse de la reconnaissance des CV-B par la protéine des complexes bifides :

VI.1. Recherche in silico au sein des complexes bifides de zones homologues aux empreintes du virus sur le récepteur CAR

L'infection des cellules cibles avec CV-B4 E2 repose sur la liaison du virus au récepteur cellulaire CAR (« Coxsackievirus and Adenovirus receptor »). Par conséquent, l'inhibition de l'infection par pré-incubation du CV-B4 avec soit les complexes bifides ou la protéine recombinante comme observé dans nos expériences suggèrent que les protéines de bifidobactéries peuvent interagir avec les sites viraux de liaison au récepteur CAR, bloquant par conséquent ces sites. Parmi les virus Coxsackie, la structure X-ray de CV-B3 est la seule structure disponible. Pour détecter des cibles peptidiques possibles au sein des protéines bifides, les séquences correspondant aux zones de liaison du récepteur CAR sur la VP1 (renflement nord de la dépression virale) et sur la VP2 (boursoufflure « puff ») ont été alignées avec les séquences protéiques des lipoprotéines *B. longum* et *B. breve* (Fig. 25a). Bien que la chaîne entre les deux séquences de bifidobactéries homologues soit plus longue que celle entre les séquences du récepteur CAR, les structures tertiaires indiquent que les distances sont équivalentes (Fig. 25b, c).

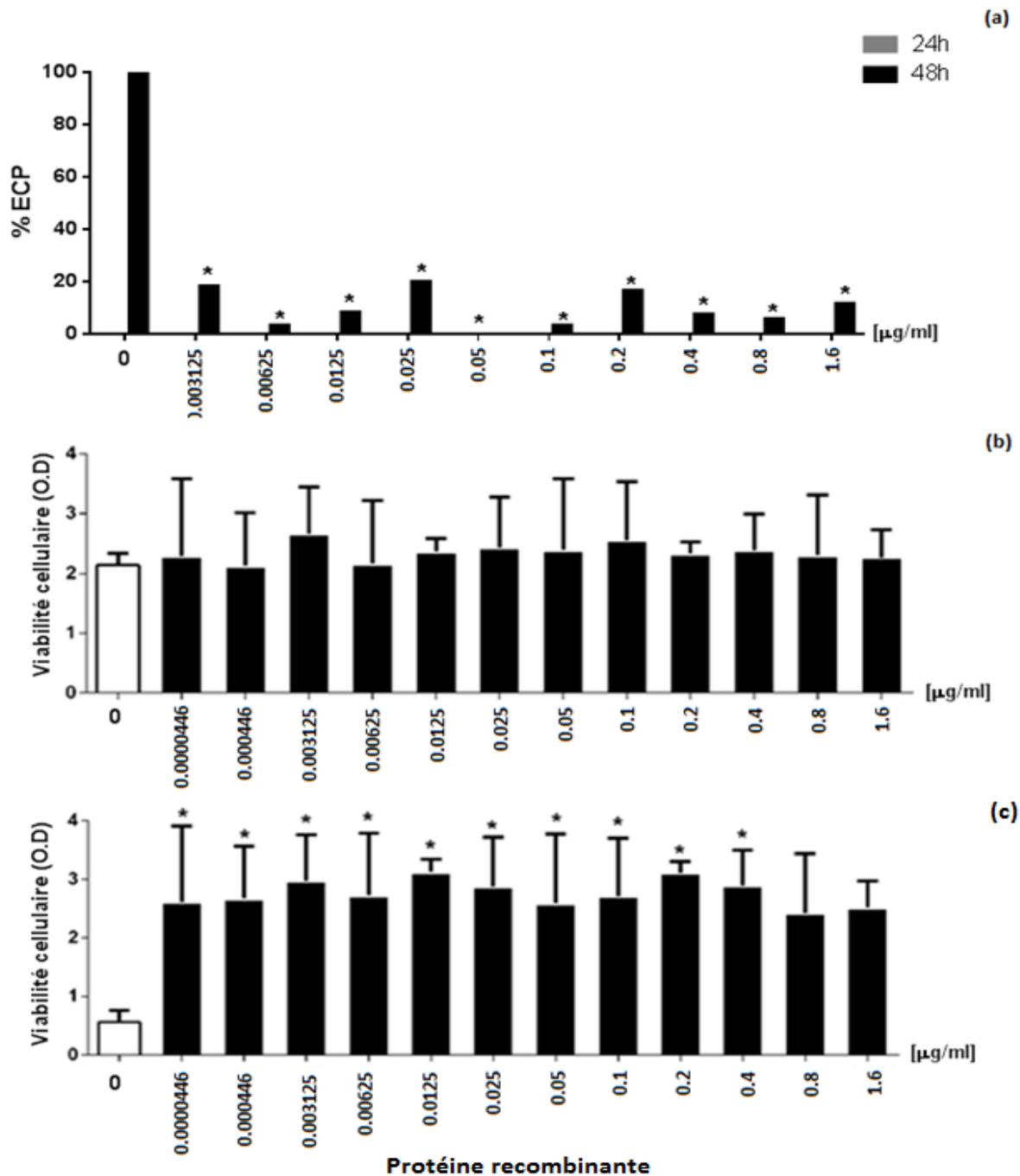
Figure 25. Séquences bifides homologues aux empreintes consensus sur le récepteur CAR (18,2% et 30,0% avec les zones CAR reconnaissant la zone north rim et puff respectivement), (b) Structure tertiaire de l'empreinte consensus du virus sur CAR (référence PDB: c3jz7a) avec 87,1% de confiance (c) Structure tertiaire de l'empreinte consensus du virus de la protéine à domaine CHA (référence PDB: c2k3aA) avec plus de 99% de confiance. La structure tertiaire de l'empreinte consensus du virus sur le récepteur CAR et les protéines bifides sont prédites en utilisant Phyre 2.0.



VI.2 Effet protecteur de la vitalité cellulaire par incubation de la protéine recombinante avec le CV-B3

Pour valider le modèle CV-B3 utilisé, il est nécessaire de vérifier qu'au moins la protéine recombinante issue de la séquence de *B. longum* CBi0703 présente la même efficacité que vis-à-vis de CV-B4. Lorsque le CV-B3 est incubé une heure avec une série de doses de la protéine recombinante, les ECP observés sont négligeables à 48h quelle que soit la dose essayée (Figure 26a). Les résultats de viabilité cellulaire effectués corroborent l'effet protecteur observé à la lecture des ECP (Figure 26b).

Figure 26. Effet cytopathique de la Pré-incubation de la Protéine recombinante avec le CV-B3, 24h et 48h post-infection. Les résultats sont exprimés comme moyen de DO±SD (n= 2 expériences). * P = 0,0001 par rapport à 0 (pas rPr incubé avec incubation avant CV-B3), P= 0.0001 vs 0 (HEp-2+CV-B3). La viabilité cellulaire à (b) 24h et (c) 48h avec des concentrations croissantes de Pr, a été évaluée par le Crystal violet.



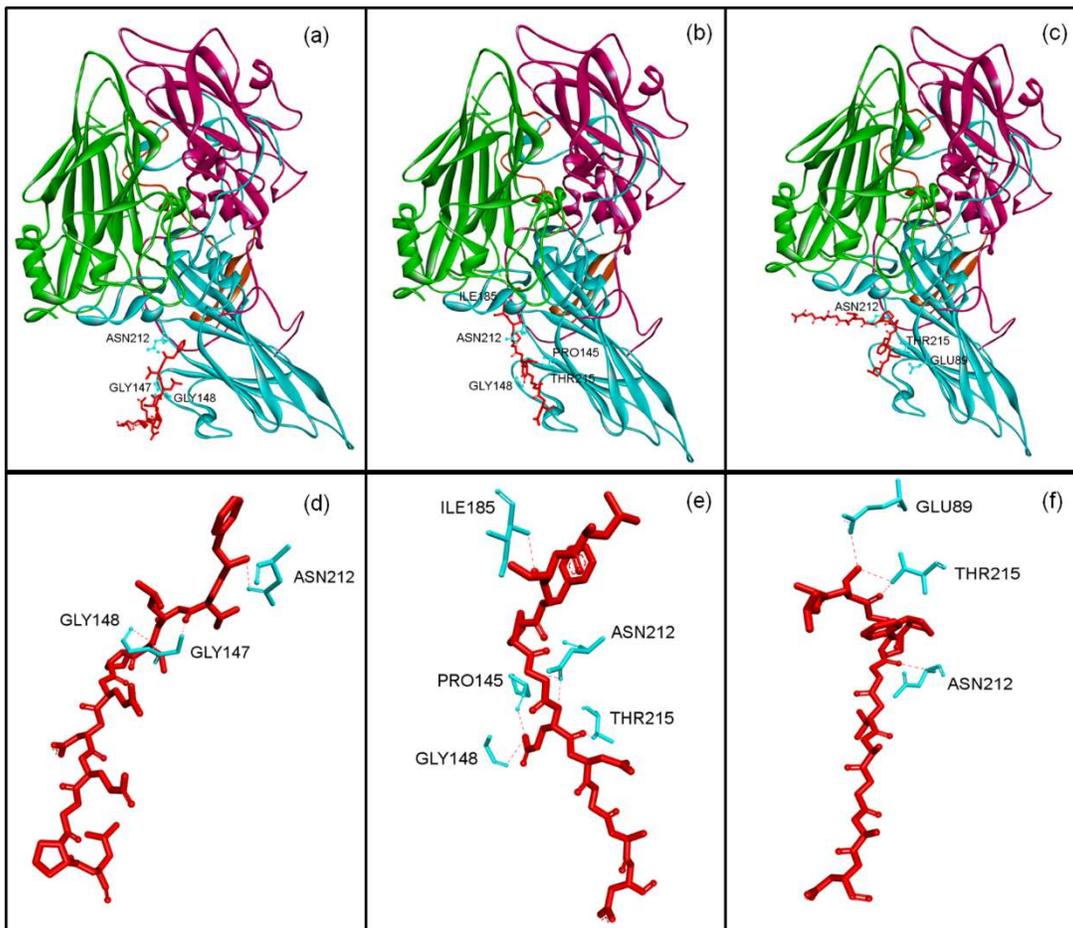
Conclusion

La protéine recombinante présente un effet protecteur via l'infection par le CVB4 et CvB3.

VI.3 Calcul de l'arrimage moléculaire entre la VP1 du CV-B3 et la protéine

Le calcul de l'arrimage moléculaire en utilisant (logiciel Autodock Vina) la séquence du CAR de l'empreinte du nord canyon de rim avec les séquences homologues de *B. breve* et de *B. longum*, a donné des liaisons d'affinité négative entre le CV-B3 et le récepteur CAR, soit pour le récepteur CAR des valeurs comprises entre (-4,8 et -4,5), pour *B. longum* des valeurs entre (-5,2 et -4,5) et pour *B. breve* des valeurs entre (-6,2 et - 5,9) kcal / mole. La faible énergie de liaison (négative) a montré un système stable pour les peptides sélectionnés et par conséquent une interaction probable de liaison peu prendre place avec les CV-B. Les valeurs les plus basses sont visualisées à l'aide du logiciel Discovery Studio et le calcul du champ de force est effectué par CHARMM (Fig. 27). Plusieurs hydrogènes qui interagissent avec le VP1 sont déjà décrits pour leur contact avec le rebord nord de la dépression virale en particulier comme suit : VP1: GLY148: CAR O-: Ser5: N, VP1: ASN212: OD1-CAR: PHE2: N (Fig. 27d). En plus suivant d'autres liaisons d'hydrogène avec les peptides de *B. longum* de GLY148: O et ASN212: OD1, des interactions supplémentaires de liaison hydrogène du peptide *B. longum* sont trouvées en contact avec les résidus de VP1, en particulier avec PRO145 et avec Thr215 (figure 27e.). En plus, l'addition de ASN212 et Thr215, ont suggéré une interaction possible entre l'hydrogène avec le peptide de *B. breve* qui a été identifié en contact avec le résidu de contact 89 sur la VP1 (Fig. 27f).

Figure 27. Interaction entre *coxsackievirus B* avec le north canyon rim de l’empreinte du CAR ou avec les peptides homologues des agrégats des lipoprotéines. (a) Coxsackie B3 (PDB: 1COV) lié avec l’empreinte du nord rim du CAR peptide (rouge). VP1, VP2, VP3 et VP4 chaînes sont indiqués en bleu cyan, vert, magenta et orange, respectivement, (b) la liaison CV-B3 avec le peptide de *B. longum*, (c) CV-B3 avec lié au peptide de *B. breve*. Les interactions de liaison d’hydrogène avec des résidus de contact de virus sont présentées en rouge pointillés. (D) L’hydrogène qui se avec le canyon du nord de footprint sur le peptide du CAR, (e) la liaison hydrogène avec le peptide de *B. longum*, (f) une liaison d’hydrogène avec le peptide de *B. breve*. Les résidus de contact du virus de VP1 sont annotés et présentés en bleu cyan.



Chapitre 4

IV- Discussion

Ce travail portant sur le rôle possible des bifidobactéries vis-à-vis de l'infection par le CV-B4 et CV-B3, a pu montrer plusieurs effets *in vitro*.

I. Bifidobactéries et CV-B4 :

Les bifidobactéries dont la mort est induite par oxydation, n'ont pas d'effet de protection de la viabilité cellulaire lors de l'infection de cellules HEp-2 par le CV-B4, sauf pour des souches connues pour leur capacité à sécréter dans le bouillon de culture des lipoprotéines de paroi comportant un domaine CHAP (peptidase/ amidohydrolase dépendante de la cystéine et de l'histidine) (*B. longum* CBi0703 et *B. breve* CFPL C50) (Scuotto et al., 2014) ; (Scuotto et al., 2016). Dans ce cas, seule l'incubation avec le virus avant infection des cellules protège partiellement la viabilité cellulaire. Par contre, on remarque que, si la population bifide sécrétrice est en phase de décroissance au moment du traitement oxydant (*B. longum* CBi0703 72h), l'effet protecteur est accentué. La phase de décroissance est en partie liée au stress acide, les bifidobactéries étant inhibées par les acides lactiques et acétiques qu'elles produisent (Mozzetti et al., 2013) ; (Cui et al., 2016). Or, la libération de lipoprotéines sous forme de complexes dans le milieu de culture débute lorsque la phase exponentielle de croissance s'infléchit pour entrer dans la phase stationnaire. La concentration de lipoprotéines à domaine CHAP augmente ensuite dans le milieu de culture, parallèlement à l'augmentation de la synthèse de l'acide lactique par rapport à celle de l'acide acétique (Scuotto et al., 2016) ; (Monteagudo-Mera et al., 2016). L'intensification de la sécrétion en période de stress acide pourrait donc indiquer une teneur accrue en lipoprotéines à domaine CHAP dans la paroi des bifidobactéries. L'hypothèse que les différences d'efficacité entre les cultures de *B. longum* de 18h (début de la phase stationnaire) et

72h (phase de décroissance), repose sur l'expression en lipoprotéines demande donc de faire la preuve que les lipoprotéines sont le support de l'activité. Les essais anti-viraux effectués avec les complexes bifides qui correspondent aux agrégats de lipoprotéines à domaine CHAP formés avec les oligosaccharides lors de la libération dans le milieu de culture, et plus spécifiquement l'essai des propriétés anti-virale de la protéine recombinante comprenant le domaine CHAP, confirment l'efficacité des structures lipoprotéiques dans la protection anti-CV-B4. Ces éléments confortent l'hypothèse que l'effet protecteur de viabilité cellulaire induit par les deux souches de bifidobactéries reflète la teneur augmentée en lipoprotéines bifides de leur paroi.

Cependant, une question demeure. Les bifidobactéries mortes ne montrent pas d'activité protectrice par incubation des cellules HEp-2 avant infection par CV-B4. Or dans un modèle de cellules jéjunales porcines infectées par le virus de la stomatite vésiculaire (virus enveloppé à ARN anti-sens simple brin de la famille des *Rhabdoviridae*), l'incubation de bifidobactéries vivantes et des cellules IPEC-J2 (cellules épithéliales du jéjunum de porc) avant infection protègent la viabilité des cellules par adsorption compétitive des virus à leur surface (Botic et al., 2007).

Dans notre travail la protection observée avec les souches *B. longum* CBi0703 et *B. breve* CFPL C50 ne fonctionne pas lorsque les souches sont incubées avec les cellules HEp-2 avant infection par le CV-B4. Une explication tient aux propriétés auto-agrégantes des deux souches, qui limitent la capacité d'adhésion aux cellules. Les bifidobactéries ne pouvant couvrir la surface cellulaire, elles laisseraient les récepteurs CAR accessibles au CV-B4. Dans cette hypothèse, la cinétique de reconnaissance par le CV-B4 du récepteur cellulaire CAR est à comparer à celle des mimétiques lipoprotéiques du récepteur CAR exposés à la surface des bifidobactéries. La différence de cinétique conditionne probablement l'infection. Dans le cas d'une incubation d'une heure des bifidobactéries avec le CV-B4 avant contact avec les cellules HEp-2, le temps

nécessaire à la reconnaissance entre virions et mimétiques lipoprotéiques du CAR est suffisant pour que les particules virales soient dans leur majorité liées aux bifidobactéries, ce qui protège *in fine* les cellules HEp-2 de l'infection. En absence d'une pré-incubation bactérie-virus, la vitesse de reconnaissance et l'affinité des virions est probablement en faveur du récepteur CAR. Par contre, l'absence d'activation de la réponse cellulaire par la souche CFPL C50 est inattendue. Les complexes bifides comprenant les lipoprotéines avec domaine CHAP sont réputés reconnaître le TLR2 (Hoarau et al., 2006); (Scuotto et al., 2016). Les cellules HEp-2 exposent à leur surface des récepteurs de type Toll (TLRs), en particulier le TLR2 (Rizzo et al., 2013). La modulation des récepteurs TLRs2 et 4 des cellules HEp-2 par interaction avec *Lactobacillus plantarum* est d'ailleurs à l'origine du contrôle de l'infection induite par *Streptococcus pyogenes*. En outre, l'activation du TLR2 induit une réponse en interféron dans un le contexte d'infection par les Coxsackievirus (Roberts, 2013). L'incubation de la souche *B. breve* CFPL C50 avec les cellules HEp-2 n'induisant pas d'effet protecteur, il est possible que l'interaction avec les TLRs exposés à la surface des cellules soit trop faible pour observer un effet significatif. Mais le fait que les lipoprotéines reconnaissent le complexe TLR2/6 peut également expliquer l'absence de protection. C'est en effet l'activation de la cascade via le complexe TLR1/2 qui est impliquée dans les réponses anti-virales (Roberts, 2013) ; (Saeed et al., 2015). Par ailleurs, dans un essai utilisant des leucocytes sanguins, l'espèce *B. breve* montre une faible capacité à stimuler la production d'IFN gamma sauf si le récepteur TLR2 est bloqué par un anticorps anti-TLR2 (Plantinga et al., 2011). En fait la voie principale de production des cytokines par *B. breve* implique la stimulation du TLR9, à l'instar du mécanisme décrit pour les lactobacilles. Mais contrairement à ces derniers, *B. breve* reconnaît parallèlement le TLR2 ce qui tempère la production d'IFN en inhibant partiellement la cascade activée lors de la reconnaissance du TLR9.

Enfin, il est intéressant de noter que la protection anti-virale par stimulation de l'IFN est obtenue avec les extraits filtrés de bifidobactéries lysées par sonication et non les bactéries entières (Kim et al., 2014). Ce sont donc des molécules du cytosol des bifidobactéries, qui activent la voie de l'IFN.

I.2. Complexes bifides et CV-B4 :

Les lipoprotéines des deux souches d'intérêt (*B. longum* CBi0703 et *B. breve* CFPL C50) sont produites dans le milieu dédié à la sécrétion, sous forme de complexes bifides. Ces complexes montrent non seulement un effet protecteur de viabilité cellulaire mais également un effet anti-viral à condition que les lipoprotéines soient incubées avec le CV-B4 avant infection des cellules HEp-2, c'est-à-dire dans les conditions dans lesquelles s'exprime la protection de la viabilité cellulaire par les deux souches de bifidobactéries.

A l'instar des différences de protection de viabilité cellulaire obtenues avec *B. longum* CBi0703 et *B. breve* CFPL C50, l'efficacité anti-virale des complexes de *B. longum* est plus marquée. Plusieurs hypothèses peuvent être évoquées pour expliquer ces différences d'efficacité entre complexes bifides, en particulier une moindre affinité au virus CV-B4 du complexe bifide de *B. breve* CFPL C50. L'affinité pour une des zones virales de reconnaissance par le CAR, le rebord nord de la dépression de la VP1 (North rim) calculée avec le logiciel Autodock Vina permet d'évaluer en partie l'influence de l'affinité sur l'efficacité. Le calcul d'affinité du récepteur CAR pour la zone correspondant au rebord nord de la dépression de la VP1 donne des valeurs entre -4,8 et -4,5 kcal/mole. Le calcul pour le peptide de *B. longum* CBi0703 homologue au CAR donne une gamme d'affinité allant de -5,2 à -4,5 kcal/mole. Enfin, l'affinité du peptide *B. breve* CFPL C50 homologue au CAR varie entre -6.2- et -5.9. Moins l'énergie nécessaire à la reconnaissance est élevée, plus le peptide est considéré comme affine pour la zone virale considérée. Il semble

donc que le peptide *B. breve* CFPL C50 homologue au CAR est le plus affine ce qui exclue l'hypothèse d'une moindre affinité comme base de l'efficacité inférieure du complexe bifide de *B. breve* CFPL C50. Cependant, il est nécessaire de vérifier que la deuxième zone de reconnaissance avec le virus donne les mêmes résultats. La deuxième zone de reconnaissance du récepteur CAR cible le renflement (puff) de la VP2. Certes, la variabilité, au sein des souches virales CV-B3 et CV-B4, de la séquence cible de la VP2, rend la zone moins indispensable pour la reconnaissance avec le récepteur CAR. Mais comme cette variabilité empêche de modéliser avec la même exactitude l'affinité entre le récepteur CAR et la séquence VP2 viral, la prédiction d'affinité entre peptides homologues et VP2 a peu de pertinence. Une analyse cristallographique de la reconnaissance entre protéines virales et protéine bifide à domaine CHAP permettrait de trancher la question de l'importance de l'affinité pour les zones de reconnaissance virales dans l'efficacité des complexes bifides.

Mais d'ors et déjà, le fait que le peptide du complexe de *B. breve* soit le plus affine pour la zone consensus de VP1, fait suspecter que sa moindre efficacité est due à des phénomènes complémentaires. L'incubation des virions avec les complexes bifides retarde la propagation virale mais ne l'abroge pas puisque, sans renouvellement du milieu, le taux de virions est identique après 3 jours de culture, quel que soit le traitement de l'inoculum avant infection. Cette multiplication tardive s'explique par la résistance des complexes bifides à la lyse par les protéases cellulaires pendant les premières 48h d'incubation (Scuotto et al., 2016). Or le complexe de *B. breve* CFPL C50 est plus sensible aux protéases que celui issu de *B. longum* CBi0703. Cependant, la protéine recombinante est d'efficacité équivalente à celle du complexe de *B. longum* CBi0703 d'origine, bien que la structure protéique soit dépourvue de chaînes d'acides gras et donc moins protégée des attaques protéasiques. Par voie de conséquence, la

différence de sensibilité aux protéases ne paraît pas jouer un rôle majeur dans la différence d'efficacité.

Par contre, la propagation virale tardive observée après inoculation de virions traités par les complexes est le signe que quelques virions échappent à la reconnaissance par les complexes bifides, infectent des cellules HEp-2 et entrent dans le cycle viral. Au contraire du complexe bifide de *B. longum* CBI0703, le complexe bifide de *B. breve* CFPL C50 est reconnu par le récepteur TLR2, dont la stimulation provoque la modulation de la réponse du TLR9 et de la production d'interféron (Plantinga et al., 2011). Pour l'heure, aucune des doses essayées n'a montré une complète inefficacité anti-virale ce qui autorise à penser que, même si certains sites viraux n'ont pu être reconnus par les complexes bifides, ces derniers sont en excès par rapport au nombre de particules virales de l'inoculum. Comme la reconnaissance du TLR2 par *Bifidobacterium breve* s'accompagne d'une diminution de la réponse du TLR9, et par voie de conséquence de la sécrétion d'IFN, il est possible que la même stimulation du TLR2 par les complexes bifides pourrait favoriser en partie la propagation du virus (Plantinga et al., 2011).

L'effet potentiellement dual des complexes *B. breve* CFPL C50 demande une exploration plus poussée. En effet, la souche est utilisée pour produire des composés bifides dans des laits infantiles. La capacité à induire une réponse anti-inflammatoire est recherchée pour mimer les effets du lait de femme. Cependant, une tolérance à la propagation des virions par activation de la voie du TLR2, qui contrebalancerait l'efficacité anti-virale liée à l'affinité de la structure protéique pour le CV-B, demande à être quantifiée dans un contexte épidémiologique d'incidence augmentée du diabète de type 1. L'exploration de la voie des TLRs de cellules HEp-2 permettrait d'estimer le degré d'implication de l'activation du TLR2 dans la moindre efficacité des complexes *B. breve* CFPL C50. En absence de renouvellement des doses de complexes, on peut considérer que les particules virales libérées entre 48 et 72h d'incubation cellulaire ne sont plus

en contact avec les agrégats natifs. C'est pendant les premiers jours d'incubation que devrait être évaluée la balance efficacité/risque.

Enfin, si ce travail a permis de mettre en lumière le potentiel anti-coxsackievirus des lipoprotéines à domaine CHAP de la paroi des bifidobactéries, le mécanisme d'action en partie élucidé indique que le spectre d'activité pourrait être restreint aux seuls coxsackievirus et aux adénovirus. En effet, c'est en mimant le récepteur CAR que les complexes bifides peuvent contrer la reconnaissance virus-cellules. La recherche d'homologie avec d'autres récepteurs viraux permettrait de prédire si le spectre d'activité des lipoprotéines à domaine CHAP est étroit ou si d'autres virus peuvent être inhibés.

Conclusion et perspectives :

En résumé, ce travail a permis de :

- détecter au sein des bifidobactéries des souches potentiellement intéressantes pour prévenir l'infection par CV-B4
- confirmer *in vitro* que les lipoprotéines bifides à domaine CHAP sous forme agrégées sont efficaces en prévention anti-CV-B4,
- identifier la protéine à domaine CHAP comme structure des lipoprotéines impliquée dans la prévention de l'infection par CV-B4
- identifier au sein du récepteur CAR les peptides potentiellement impliqués dans la reconnaissance du virus par les lipoprotéines

Plusieurs travaux sont à envisager pour compléter l'analyse du mécanisme de reconnaissance des virions par la structure protéique, l'implication de l'engagement du TLR2 dans l'efficacité des complexes bifides, le spectre d'action des complexes bifides. Enfin, il reste à démontrer l'efficacité préventive *in vivo* des complexes bifides et/ou des bifidobactéries sécrétrices de lipoprotéines à domaine CHAP.

Références

- Abdel-Hamid, M.K., McCluskey, A., 2014. In silico docking, molecular dynamics and binding energy insights into the bolinaquinone-clathrin terminal domain binding site. *Molecules* 19, 6609-6622.
- Baffoni, L., Stenico, V., Strahsburger, E., Gaggia, F., Di Gioia, D., Modesto, M., Mattarelli, P., Biavati, B., 2013. Identification of species belonging to the *Bifidobacterium* genus by PCR-RFLP analysis of a hsp60 gene fragment. *BMC microbiology* 13, 149.
- Berrada, N., Lemeland, J.F., Laroche, G., Thouvenot, P., Piaia, M., 1991. *Bifidobacterium* from fermented milks: survival during gastric transit. *Journal of dairy science* 74, 409-413.
- Botic, T., Klingberg, T.D., Weingartl, H., Cencic, A., 2007. A novel eukaryotic cell culture model to study antiviral activity of potential probiotic bacteria. *International journal of food microbiology* 115, 227-234.
- Buchanan, R.E., Gibbons, N.E., 1972. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*.
- Cardelle-Cobas, A., Fernandez, M., Salazar, N., Martinez-Villaluenga, C., Villamiel, M., Ruas-Madiedo, P., de los Reyes-Gavilan, C.G., 2009. Bifidogenic effect and stimulation of short chain fatty acid production in human faecal slurry cultures by oligosaccharides derived from lactose and lactulose. *The Journal of dairy research* 76, 317-325.
- Cerning, J., Renard, C.M., Thibault, J.F., Bouillanne, C., Landon, M., Desmazeaud, M., Topisirovic, L., 1994. Carbon Source Requirements for Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus casei* CG11 and Partial Structure Analysis of the Polymer. *Applied and environmental microbiology* 60, 3914-3919.
- Chenoll, E., Casinos, B., Bataller, E., Buesa, J., Ramon, D., Genoves, S., Fabrega, J., Rivero Urgell, M., Moreno Munoz, J.A., 2016. Identification of a Peptide Produced by *Bifidobacterium longum* CECT 7210 with Antitroviral Activity. *Frontiers in microbiology* 7, 655.
- Cleusix, V., Lacroix, C., Dasen, G., Leo, M., Le Blay, G., 2010. Comparative study of a new quantitative real-time PCR targeting the xylulose-5-phosphate/fructose-6-phosphate phosphoketolase bifidobacterial gene (xfp) in faecal samples with two fluorescence in situ hybridization methods. *Journal of applied microbiology* 108, 181-193.
- Cronin, M., Morrissey, D., Rajendran, S., El Mashad, S.M., van Sinderen, D., O'Sullivan, G.C., Tangney, M., 2010. Orally administered bifidobacteria as vehicles for delivery of agents to systemic tumors. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 18, 1397-1407.
- Crowell, R.L., Landau, B.J., 1997. A short history and introductory background on the coxsackieviruses of group B. *Current topics in microbiology and immunology* 223, 1-11.
- Cui, S.M., Zhao, J.X., Liu, X.M., Chen, Y.Q., Zhang, H., Chen, W., 2016. Maximum-biomass concentration prediction for *Bifidobacteria* in the pH-controlled fed-batch culture. *Letters in applied microbiology* 62, 256-263.

Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M., Palenzona, D., 2000. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters in applied microbiology* 31, 438-442.

Dong, X., Xin, Y., Jian, W., Liu, X., Ling, D., 2000. *Bifidobacterium thermacidophilum* sp. nov., isolated from an anaerobic digester. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 50 Pt 1, 119-125.

Dotta, F., Censini, S., van Halteren, A.G., Marselli, L., Masini, M., Dionisi, S., Mosca, F., Boggi, U., Muda, A.O., Del Prato, S., Elliott, J.F., Covacci, A., Rappuoli, R., Roep, B.O., Marchetti, P., 2007. Coxsackie B4 virus infection of beta cells and natural killer cell insulinitis in recent-onset type 1 diabetic patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 5115-5120.

Fanning, S., Hall, L.J., Cronin, M., Zomer, A., MacSharry, J., Goulding, D., Motherway, M.O., Shanahan, F., Nally, K., Dougan, G., van Sinderen, D., 2012. Bifidobacterial surface-exopolysaccharide facilitates commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 2108-2113.

Flodstrom, M., Maday, A., Balakrishna, D., Cleary, M.M., Yoshimura, A., Sarvetnick, N., 2002. Target cell defense prevents the development of diabetes after viral infection. *Nature immunology* 3, 373-382.

Fooks, L.J., Gibson, G.R., 2002. Probiotics as modulators of the gut flora. *The British journal of nutrition* 88 Suppl 1, S39-49.

Froni, E., Serafini, F., Amidani, D., Turrone, F., He, F., Bottacini, F., O'Connell Motherway, M., Viappiani, A., Zhang, Z., Rivetti, C., van Sinderen, D., Ventura, M., 2011. Genetic analysis and morphological identification of pilus-like structures in members of the genus *Bifidobacterium*. *Microbial cell factories* 10 Suppl 1, S16.

Freimuth, P., Philipson, L., Carson, S.D., 2008. The coxsackievirus and adenovirus receptor. *Curr Top Microbiol Immunol* 323, 67-87.

Gavini, F., Pourcher, A.M., Neut, C., Monget, D., Romond, C., Oger, C., Izard, D., 1991. Phenotypic differentiation of bifidobacteria of human and animal origins. *International journal of systematic bacteriology* 41, 548-557.

Guarner, F., Malagelada, J.R., 2003. Gut flora in health and disease. *Lancet* 361, 512-519.

Gueimonde, M., Garrigues, C., van Sinderen, D., de los Reyes-Gavilan, C.G., Margolles, A., 2009. Bile-inducible efflux transporter from *Bifidobacterium longum* NCC2705, conferring bile resistance. *Applied and environmental microbiology* 75, 3153-3160.

Guglielmetti, S., Tamagnini, I., Minuzzo, M., Arioli, S., Parini, C., Comelli, E., Mora, D., 2009. Study of the adhesion of *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75 to human intestinal cell lines. *Current microbiology* 59, 167-172.

Hidalgo-Cantabrana, C., Sanchez, B., Milani, C., Ventura, M., Margolles, A., Ruas-Madiedo, P., 2014. Genomic overview and biological functions of exopolysaccharide biosynthesis in *Bifidobacterium* spp. *Applied and environmental microbiology* 80, 9-18.

Hoarau, C., Lagaraine, C., Martin, L., Velge-Roussel, F., Lebranchu, Y., 2006. Supernatant of *Bifidobacterium breve* induces dendritic cell maturation, activation, and survival through a Toll-like receptor 2 pathway. *The Journal of allergy and clinical immunology* 117, 696-702.

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

Hober, D., Sane, F., 2011. Enteroviruses and type 1 diabetes. *BMJ* 342, c7072.

Hober, D., Sauter, P., 2010. Pathogenesis of type 1 diabetes mellitus: interplay between enterovirus and host. *Nat Rev Endocrinol* 6, 279-289.

Hoskins, L.C., Agustines, M., McKee, W.B., Boulding, E.T., Kriaris, M., Niedermeyer, G., 1985. Mucin degradation in human colon ecosystems. Isolation and properties of fecal strains that degrade ABH blood group antigens and oligosaccharides from mucin glycoproteins. *The Journal of clinical investigation* 75, 944-953.

Iwasaki, H., Araki, Y., Ito, E., Nagaoka, M., Yokokura, T., 1990. Structure of macroamphiphiles from several *Bifidobacterium* strains. *Journal of bacteriology* 172, 845-852.

Izquierdo, E., Medina, M., Ennahar, S., Marchioni, E., Sanz, Y., 2008. Resistance to simulated gastrointestinal conditions and adhesion to mucus as probiotic criteria for *Bifidobacterium longum* strains. *Current microbiology* 56, 613-618.

Jaidane, H., Sauter, P., Sane, F., Goffard, A., Gharbi, J., Hober, D., 2010. Enteroviruses and type 1 diabetes: towards a better understanding of the relationship. *Reviews in medical virology* 20, 265-280.

James, K., Motherway, M.O., Bottacini, F., van Sinderen, D., 2016. *Bifidobacterium breve* UCC2003 metabolises the human milk oligosaccharides lacto-N-tetraose and lacto-N-neo-tetraose through overlapping, yet distinct pathways. *Scientific reports* 6, 38560.

Jarocki, P., Podlesny, M., Komon-Janczara, E., Kucharska, J., Glibowska, A., Targonski, Z., 2016. Comparison of various molecular methods for rapid differentiation of intestinal *bifidobacteria* at the species, subspecies and strain level. *BMC microbiology* 16, 159.

Junick, J., Blaut, M., 2012. Quantification of human fecal *bifidobacterium* species by use of quantitative real-time PCR analysis targeting the *groEL* gene. *Applied and environmental microbiology* 78, 2613-2622.

Kanno, T., Kim, K., Kono, K., Drescher, K.M., Chapman, N.M., Tracy, S., 2006. Group B coxsackievirus diabetogenic phenotype correlates with replication efficiency. *Journal of virology* 80, 5637-5643.

Kaplan, H., Hutkins, R.W., 2000. Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Applied and environmental microbiology* 66, 2682-2684.

Kawahara, T., Takahashi, T., Oishi, K., Tanaka, H., Masuda, M., Takahashi, S., Takano, M., Kawakami, T., Fukushima, K., Kanazawa, H., Suzuki, T., 2015. Consecutive oral administration of *Bifidobacterium longum* MM-2 improves the defense system against influenza virus infection by enhancing natural killer cell activity in a murine model. *Microbiology and immunology* 59, 1-12.

Khetsuriani, N., Lamonte-Fowlkes, A., Oberst, S., Pallansch, M.A., 2006. Enterovirus surveillance--United States, 1970-2005. *MMWR Surveill Summ* 55, 1-20.

Kim, M.J., Lee, D.K., Park, J.E., Park, I.H., Seo, J.G., Ha, N.J., 2014. Antiviral activity of *Bifidobacterium adolescentis* SPM1605 against Coxsackievirus B3. *Biotechnology, biotechnological equipment* 28, 681-688.

Koebmann, B.J., Westerhoff, H.V., Snoep, J.L., Solem, C., Pedersen, M.B., Nilsson, D., Michelsen, O., Jensen, P.R., 2002. The extent to which ATP demand controls the glycolytic flux depends strongly on the organism and conditions for growth. *Molecular biology reports* 29, 41-45.

Kullen, M.J., Klaenhammer, T.R., 1999. Identification of the pH-inducible, proton-translocating F1F0-ATPase (atpBEFHAGDC) operon of *Lactobacillus acidophilus* by differential display: gene structure, cloning and characterization. *Molecular microbiology* 33, 1152-1161.

Lauer, E., Kandler, O., 1976. [Mechanism of the variation of the acetate/lactate/ratio during glucose fermentation by bifidobacteria (author's transl)]. *Archives of microbiology* 110, 271-277.

Leahy, S.C., Higgins, D.G., Fitzgerald, G.F., van Sinderen, D., 2005. Getting better with bifidobacteria. *Journal of applied microbiology* 98, 1303-1315.

Lee, C.J., Huang, Y.C., Yang, S., Tsao, K.C., Chen, C.J., Hsieh, Y.C., Chiu, C.H., Lin, T.Y., 2014. Clinical features of coxsackievirus A4, B3 and B4 infections in children. *PLoS One* 9, e87391.

Lind, K., Huhn, M.H., Flodstrom-Tullberg, M., 2012. Immunology in the clinic review series; focus on type 1 diabetes and viruses: the innate immune response to enteroviruses and its possible role in regulating type 1 diabetes. *Clinical and experimental immunology* 168, 30-38.

Looijesteijn, P.J., Trapet, L., de Vries, E., Abee, T., Hugenholtz, J., 2001. Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*. *International journal of food microbiology* 64, 71-80.

Lugli, G.A., Milani, C., Turrone, F., Duranti, S., Ferrario, C., Viappiani, A., Mancabelli, L., Mangifesta, M., Tamini, B., Delcenserie, V., van Sinderen, D., Ventura, M., 2014. Investigation of the evolutionary development of the genus *Bifidobacterium* by comparative genomics. *Applied and environmental microbiology* 80, 6383-6394.

Marco, M.L., Pavan, S., Kleerebezem, M., 2006. Towards understanding molecular modes of probiotic action. *Current opinion in biotechnology* 17, 204-210.

Matsuki, T., Watanabe, K., Tanaka, R., Fukuda, M., Oyaizu, H., 1999. Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers. *Applied and environmental microbiology* 65, 4506-4512.

Mattarelli, P., Holzapfel, W., Franz, C.M., Endo, A., Felis, G.E., Hammes, W., Pot, B., Dicks, L., Dellaglio, F., 2014. Recommended minimal standards for description of new taxa of the genera *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and related genera. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 64, 1434-1451.

Maus, J.E., Ingham, S.C., 2003. Employment of stressful conditions during culture production to enhance subsequent cold- and acid-tolerance of bifidobacteria. *Journal of applied microbiology* 95, 146-154.

Miyake, T., Watanabe, K., Watanabe, T., Oyaizu, H., 1998. Phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* and related genera based on 16S rDNA sequences. *Microbiology and immunology* 42, 661-667.

Monteagudo-Mera, A., Arthur, J.C., Jobin, C., Keku, T., Bruno-Barcena, J.M., Azcarate-Peril, M.A., 2016. High purity galacto-oligosaccharides enhance specific *Bifidobacterium* species and their metabolic activity in the mouse gut microbiome. *Beneficial microbes* 7, 247-264.

Mozzetti, V., Grattepanche, F., Berger, B., Rezzonico, E., Arigoni, F., Lacroix, C., 2013. Fast screening of *Bifidobacterium longum* sublethal stress conditions in a novel two-stage continuous culture strategy. *Beneficial microbes* 4, 167-178.

Mukai, T., Englert, M., Tripp, H.J., Miller, C., Ivanova, N.N., Rubin, E.M., Kyrpides, N.C., Soll, D., 2016. Facile Recoding of Selenocysteine in Nature. *Angew Chem Int Ed Engl* 55, 5337-5341.

Mukai, T., Kaneko, S., Matsumoto, M., Ohori, H., 2004. Binding of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus reuteri* to the carbohydrate moieties of intestinal glycolipids recognized by peanut agglutinin. *International journal of food microbiology* 90, 357-362.

Mullie, C., Yazourh, A., Thibault, H., Odou, M.F., Singer, E., Kalach, N., Kremp, O., Romond, M.B., 2004. Increased poliovirus-specific intestinal antibody response coincides with promotion of *Bifidobacterium longum*-*infantis* and *Bifidobacterium breve* in infants: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Pediatr Res* 56, 791-795.

Munoz, J.A., Chenoll, E., Casinos, B., Bataller, E., Ramon, D., Genoves, S., Montava, R., Ribes, J.M., Buesa, J., Fabrega, J., Rivero, M., 2011. Novel probiotic *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CECT 7210 strain active against rotavirus infections. *Applied and environmental microbiology* 77, 8775-8783.

O'Connell Motherway, M., O'Driscoll, J., Fitzgerald, G.F., Van Sinderen, D., 2009. Overcoming the restriction barrier to plasmid transformation and targeted mutagenesis in *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Microbial biotechnology* 2, 321-332.

Organtini, L.J., Makhov, A.M., Conway, J.F., Hafenstein, S., Carson, S.D., 2014. Kinetic and structural analysis of coxsackievirus B3 receptor interactions and formation of the A-particle. *J Virol* 88, 5755-5765.

Palframan, R.J., Gibson, G.R., Rastall, R.A., 2003. Carbohydrate preferences of *Bifidobacterium* species isolated from the human gut. *Current issues in intestinal microbiology* 4, 71-75.

Plantinga, T.S., van Maren, W.W., van Bergenhenegouwen, J., Hameetman, M., Nierkens, S., Jacobs, C., de Jong, D.J., Joosten, L.A., van't Land, B., Garssen, J., Adema, G.J., Netea, M.G., 2011. Differential Toll-like receptor recognition and induction of cytokine profile by *Bifidobacterium breve* and *Lactobacillus* strains of probiotics. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 18, 621-628.

Plevka, P., Hafenstein, S., Harris, K.G., Cifuentes, J.O., Zhang, Y., Bowman, V.D., Chipman, P.R., Bator, C.M., Lin, F., Medof, M.E., Rossmann, M.G., 2010. Interaction of decay-accelerating factor with echovirus 7. *Journal of virology* 84, 12665-12674.

Poh, T.W., Pervaiz, S., 2005. LY294002 and LY303511 sensitize tumor cells to drug-induced apoptosis via intracellular hydrogen peroxide production independent of the phosphoinositide 3-kinase-Akt pathway. *Cancer Res* 65, 6264-6274.

Ramakrishnan, M.A., 2016. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World journal of virology* 5, 85-86.

Richard, H., Foster, J.W., 2004. *Escherichia coli* glutamate- and arginine-dependent acid resistance systems increase internal pH and reverse transmembrane potential. *Journal of bacteriology* 186, 6032-6041.

Riedel, C.U., Foata, F., Goldstein, D.R., Blum, S., Eikmanns, B.J., 2006. Interaction of bifidobacteria with Caco-2 cells-adhesion and impact on expression profiles. *International journal of food microbiology* 110, 62-68.

Rizzo, A., Losacco, A., Carratelli, C.R., 2013. *Lactobacillus crispatus* modulates epithelial cell defense against *Candida albicans* through Toll-like receptors 2 and 4, interleukin 8 and human beta-defensins 2 and 3. *Immunology letters* 156, 102-109.

Roberts, C.M., Fett, W., Osman, S., Wijey, C., O' Connor, J., Hoover, D. . 2013. Exopolysaccharide production by *Bifidobacterium longum* BB-79. *Journal of applied microbiology* 78;, 463-468.

Roda, D., Perez-Martinez, E., Cabrerizo, M., Trallero, G., Martinez-Planas, A., Luaces, C., Garcia-Garcia, J.J., Munoz-Almagro, C., Launes, C., 2015. Clinical characteristics and molecular epidemiology of Enterovirus infection in infants <3 months in a referral paediatric hospital of Barcelona. *Eur J Pediatr* 174, 1549-1553.

Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., Fernandez-Garcia, M., de los Reyes-Gavilan, C.G., Margolles, A., 2008. Mucin degradation by *Bifidobacterium* strains isolated from the human intestinal microbiota. *Applied and environmental microbiology* 74, 1936-1940.

Saeed, U., Mazoor, S., Jalal, N., Zahid Piracha, Z., 2015. Contemplating the Importance of Toll-like Receptors I and II Regarding Human Viral Pathogenesis. *Jundishapur journal of microbiology* 8, e13348.

Sanchez, B., Champomier-Verges, M.C., Collado Mdel, C., Anglade, P., Baraige, F., Sanz, Y., de los Reyes-Gavilan, C.G., Margolles, A., Zagorec, M., 2007. Low-pH adaptation and the acid tolerance response of *Bifidobacterium longum* biotype *longum*. *Applied and environmental microbiology* 73, 6450-6459.

Schleifer, K.H., Kandler, O., 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriological reviews* 36, 407-477.

Scuotto, A., Djorie, S., Colavizza, M., Romond, P.C., Romond, M.B., 2014. *Bifidobacterium breve* C50 secretes lipoprotein with CHAP domain recognized in aggregated form by TLR2. *Biochimie* 107 Pt B, 367-375.

Scuotto, A., Romond, P.C., Djorie, S., Alric, M., Romond, M.B., 2016. In silico mining and characterization of bifidobacterial lipoprotein with CHAP domain secreted in an aggregated form. *Int J Biol Macromol* 82, 653-662.

Serreze, D.V., Ottendorfer, E.W., Ellis, T.M., Gauntt, C.J., Atkinson, M.A., 2000. Acceleration of type 1 diabetes by a coxsackievirus infection requires a preexisting critical mass of autoreactive T-cells in pancreatic islets. *Diabetes* 49, 708-711.

Simpson, P.J., Stanton, C., Fitzgerald, G.F., Ross, R.P., 2003. Genomic diversity and relatedness of bifidobacteria isolated from a porcine cecum. *Journal of bacteriology* 185, 2571-2581.

Slovakova, L., Duskova, D., Marounek, M., 2002. Fermentation of pectin and glucose, and activity of pectin-degrading enzymes in the rabbit caecal bacterium *Bifidobacterium pseudolongum*. *Letters in applied microbiology* 35, 126-130.

Soudee, S., Schuffenecker, I., Aberchih, J., Josset, L., Lina, B., Baud, O., Biran, V., 2014. [Neonatal enterovirus infections reported in France in 2012]. *Arch Pediatr* 21, 984-989.

Strober, W., 2015. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current protocols in immunology* 111, A3 B 1-3.

Tapparel, C., Siegrist, F., Petty, T.J., Kaiser, L., 2013. Picornavirus and enterovirus diversity with associated human diseases. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 14, 282-293.

Trott, O., Olson, A.J., 2010. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* 31, 455-461.

Turroni, F., Bottacini, F., Foroni, E., Mulder, I., Kim, J.H., Zomer, A., Sanchez, B., Bidossi, A., Ferrarini, A., Giubellini, V., Delledonne, M., Henrissat, B., Coutinho, P., Oggioni, M., Fitzgerald, G.F., Mills, D., Margolles, A., Kelly, D., van Sinderen, D., Ventura, M., 2010. Genome analysis of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 reveals metabolic pathways for host-derived glycan foraging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 19514-19519.

Turroni, F., Ribbera, A., Foroni, E., van Sinderen, D., Ventura, M., 2008. Human gut microbiota and bifidobacteria: from composition to functionality. *Antonie van Leeuwenhoek* 94, 35-50.

Turroni, F., Serafini, F., Foroni, E., Duranti, S., O'Connell Motherway, M., Taverniti, V., Mangifesta, M., Milani, C., Viappiani, A., Roversi, T., Sanchez, B., Santoni, A., Gioiosa, L., Ferrarini, A., Delledonne, M., Margolles, A., Piazza, L., Palanza, P., Bolchi, A., Guglielmetti, S., van Sinderen, D., Ventura, M., 2013. Role of sortase-dependent pili of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 in modulating bacterium-host interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 11151-11156.

Ulferts, R., van der Linden, L., Thibaut, H.J., Lanke, K.H., Leyssen, P., Coutard, B., De Palma, A.M., Canard, B., Neyts, J., van Kuppeveld, F.J., 2013. Selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine inhibits replication of human enteroviruses B and D by targeting viral protein 2C. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 57, 1952-1956.

van den Broek, L.A., Hinz, S.W., Beldman, G., Vincken, J.P., Voragen, A.G., 2008. *Bifidobacterium* carbohydrases-their role in breakdown and synthesis of (potential) prebiotics. *Molecular nutrition & food research* 52, 146-163.

van der Linden, L., Wolthers, K.C., van Kuppeveld, F.J., 2015. Replication and Inhibitors of Enteroviruses and Parechoviruses. *Viruses* 7, 4529-4562.

Van Geel-Schutten, G.H., Faber, E.J., Smit, E., Bonting, K., Smith, M.R., Ten Brink, B., Kamerling, J.P., Vliegthart, J.F., Dijkhuizen, L., 1999. Biochemical and structural characterization of the glucan and fructan exopolysaccharides synthesized by the *Lactobacillus reuteri* wild-type strain and by mutant strains. *Applied and environmental microbiology* 65, 3008-3014.

Van Laere, K.M., Hartemink, R., Bosveld, M., Schols, H.A., Voragen, A.G., 2000. Fermentation of plant cell wall derived polysaccharides and their corresponding oligosaccharides by intestinal bacteria. *Journal of agricultural and food chemistry* 48, 1644-1652.

Veerkamp, J.H., 1971. The structure of the cell wall peptidoglycan of *Bifidobacterium bifidum* var. *pennsylvanicus*. *Archives of biochemistry and biophysics* 143, 204-211.

Ventura, M., Canchaya, C., van Sinderen, D., Fitzgerald, G.F., Zink, R., 2004. *Bifidobacterium lactis* DSM 10140: identification of the *atp* (*atpBEFHAGDC*) operon and analysis of its genetic structure, characteristics, and phylogeny. *Applied and environmental microbiology* 70, 3110-3121.

Ventura, M., Canchaya, C., Zhang, Z., Bernini, V., Fitzgerald, G.F., van Sinderen, D., 2006. How high G+C Gram-positive bacteria and in particular bifidobacteria cope with heat stress: protein players and regulators. *FEMS microbiology reviews* 30, 734-759.

Ventura, M., Canchaya, C., Zhang, Z., Fitzgerald, G.F., van Sinderen, D., 2007. Molecular characterization of *hsp20*, encoding a small heat shock protein of *bifidobacterium breve* UCC2003. *Applied and environmental microbiology* 73, 4695-4703.

Ventura, M., Lee, J.H., Canchaya, C., Zink, R., Leahy, S., Moreno-Munoz, J.A., O'Connell-Motherway, M., Higgins, D., Fitzgerald, G.F., O'Sullivan, D.J., van Sinderen, D., 2005. Prophage-like elements in bifidobacteria: insights from genomics, transcription, integration, distribution, and phylogenetic analysis. *Applied and environmental microbiology* 71, 8692-8705.

Ventura, M., Turrioni, F., Zomer, A., Foroni, E., Giubellini, V., Bottacini, F., Canchaya, C., Claesson, M.J., He, F., Mantzourani, M., Mulas, L., Ferrarini, A., Gao, B., Delledonne, M., Henrissat, B., Coutinho, P., Oggioni, M., Gupta, R.S., Zhang, Z., Beighton, D., Fitzgerald, G.F., O'Toole, P.W., van Sinderen, D., 2009. The *Bifidobacterium dentium* Bd1 genome sequence reflects its genetic adaptation to the human oral cavity. *PLoS genetics* 5, e1000785.

Ventura, M., Zink, R., 2003. Comparative sequence analysis of the *tuf* and *recA* genes and restriction fragment length polymorphism of the internal transcribed spacer region sequences supply additional tools for discriminating *Bifidobacterium lactis* from *Bifidobacterium animalis*. *Applied and environmental microbiology* 69, 7517-7522.

Waddington, L., Cyr, T., Hefford, M., Hansen, L.T., Kalmokoff, M., 2010. Understanding the acid tolerance response of bifidobacteria. *Journal of applied microbiology* 108, 1408-1420.

Wang, Y., Mai, T., Liu, M.F., Chen, S.H., 2007. [Effect of lipoteichoic acid of *Bifidobacterium* on survivin and its regulatory genes]. *Zhonghua zhong liu za zhi [Chinese journal of oncology]* 29, 325-328.

Whitfield, C., Valvano, M.A., Rose, A.H., 1993. Biosynthesis and Expression of Cellsurface Polysaccharides in Gram-negative Bacteria. *Advances in Microbial Physiology, Academic Press* 35, 135-246.

Wickner, S., Maurizi, M.R., Gottesman, S., 1999. Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science* 286, 1888-1893.

Woo, P.C., Lau, S.K., Choi, G.K., Huang, Y., Sivakumar, S., Tsoi, H.W., Yip, C.C., Jose, S.V., Bai, R., Wong, E.Y., Joseph, M., Li, T., Wernery, U., Yuen, K.Y., 2016. Molecular epidemiology of canine picornavirus in Hong Kong and Dubai and proposal of a novel genus in Picornaviridae. *Infect Genet Evol* 41, 191-200.

Yang, Y., Rijnbrand, R., McKnight, K.L., Wimmer, E., Paul, A., Martin, A., Lemon, S.M., 2002. Sequence requirements for viral RNA replication and VPg uridylylation directed by the internal cis-acting replication element (*cre*) of human rhinovirus type 14. *Journal of virology* 76, 7485-7494.

Yap, I.S., Giddings, G., Pocock, E., Chantler, J.K., 2003. Lack of islet neogenesis plays a key role in beta-cell depletion in mice infected with a diabetogenic variant of coxsackievirus B4. *The Journal of general virology* 84, 3051-3068.

Yeung, W.C., Rawlinson, W.D., Craig, M.E., 2011. Enterovirus infection and type 1 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis of observational molecular studies. *BMJ* 342, d35.

Yi, Z.J., Fu, Y.R., Li, M., Gao, K.S., Zhang, X.G., 2009. Effect of LTA isolated from bifidobacteria on D-galactose-induced aging. *Experimental gerontology* 44, 760-765.

Zhurina, D., Zomer, A., Gleinser, M., Brancaccio, V.F., Auchter, M., Waidmann, M.S., Westermann, C., van Sinderen, D., Riedel, C.U., 2011. Complete genome sequence of *Bifidobacterium bifidum* S17. *Journal of bacteriology* 193, 301-302.

Zoll, J., Heus, H.A., van Kuppeveld, F.J., Melchers, W.J., 2009. The structure-function relationship of the enterovirus 3'-UTR. *Virus research* 139, 209-216.

Zomer, A., Fernandez, M., Kearney, B., Fitzgerald, G.F., Ventura, M., van Sinderen, D., 2009. An interactive regulatory network controls stress response in *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Journal of bacteriology* 191, 7039-7049.