



Ecole doctorale Biologie-Santé

Thèse de doctorat en Microbiologie, maladies transmissibles et hygiène

En vue de l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Lille

Utilisation des bactéries alimentaires et intestinales pour la bioremédiation *in vivo* des contaminants métalliques

Présentée et soutenue publiquement par

Fanny George

Le 11 Juin 2021

Thèse dirigée par le Pr Benoît Foligné et co-encadrée par le Dr Anne Garat

Dans les équipes INFINITE U 1286 et ULR 4483 IMPECS

Composition du Jury :

Pr Christophe Carnoy, Université de Lille

Pr Jean-Pierre Goullé, Université de Rouen

Pr Stéphanie Bornes, Université Clermont Auvergne

Dr Jennifer Burgain, Université de Lorraine

Dr Guillaume Dalmaso, Université Clermont Auvergne

Dr Gwenaél Jan, INRAE Institut Agro Rennes

Pr Benoît Foligné, Université de Lille

Dr Anne Garat, Université de Lille

Président du Jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Membre invité

Directeur de thèse

Co-encadrante de thèse



*« L'art de la réussite consiste à savoir
s'entourer des meilleurs »*

John Fitzgerald Kennedy

Remerciements

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements aux membres du jury pour avoir accepté de juger mon travail de thèse. Je les remercie par avance de leurs remarques et discussions, qui je le sais, seront fructueuses. Aux Pr Jean-Pierre Goullé et Pr Stéphanie Bornes d'avoir accepté d'être rapporteur-e-s. Aux Dr Jennifer Burgain et Dr Guillaume Dalmasso d'avoir accepté d'examiner ce travail, ainsi qu'au Pr Christophe Carnoy qui a accepté, en supplément, la lourde tâche de présider ce jury.

Je remercie le Dr Gwenaél Jan d'être à nos côtés pour la soutenance, mais aussi de m'avoir suivi tout au long de ces années au cours de mes comités de suivi de thèse, aux côtés du Pr Jean-Marie Lacroix que je remercie également. Ces CSI ont permis l'élaboration de certaines expériences en collaboration avec le STLO de Rennes, que je remercie au passage.

Je remercie du fond du cœur mon directeur de thèse, le Pr Benoît Foligné, ainsi que ma co-encadrante, le Dr Anne Garat. Je vous remercie de m'avoir accordé votre confiance, et de m'avoir accompagné tout au long de ce travail. Je vous remercie des longues discussions que l'on a pu avoir, et du temps que vous m'avez accordé. Benoit, je te remercie de tout ce que tu as pu faire pour moi, et d'avoir accepté de me donner une chance de revenir en laboratoire il y a 4 ans déjà. Anne, je te remercie également pour tout, mais aussi d'avoir insisté pour que je sois formée sur l'ICP afin d'acquérir de l'autonomie et des compétences. Travailler avec vous m'a beaucoup apporté, et cette thèse restera une expérience très enrichissante, autant sur le plan professionnel que personnel.

Je tiens à remercier tous les membres du laboratoire de Bactériologie-Virologie, qui ont tous contribué à leur manière à faire de cette thèse une réussite pour moi. A Christel, qui a accepté, avec Benoit, de m'intégrer au laboratoire il y a 4 ans pour un CDD ; laboratoire que je n'ai plus quitté depuis. Je vous remercie de votre bienveillance et des discussions que l'on a pu avoir. Un grand merci à Elisabeth, Marie-Françoise et Josette, aux cotés desquelles j'ai eu le plaisir d'enseigner et d'apprendre énormément sur ce métier si compliqué qu'est l'enseignement ; Elisabeth et Marie-Françoise, toujours bienveillantes, avec qui j'ai également eu le plaisir de partager mon bureau tout ce temps ! Je remercie tout particulièrement Séverine, Isabelle, Béatrice, Mélissa, mais aussi Charlotte et Laetitia parties il y a quelques temps. Plus que des collègues, vous avez toujours été là quand il le fallait, dans les bons comme les mauvais moments. Et pour ça, je ne vous remercierais jamais assez. Une bonne humeur tellement encourageante au quotidien : sans votre présence, cette thèse n'aurait pas été la même !

Je remercie également Alban, qui a été mon stagiaire pendant 2 mois, et qui au-delà de sa bonne humeur, m'a apporté beaucoup d'aide et de soutien pendant son stage, et bien après.

Merci à toute l'équipe du service d'Immunologie-Parasitologie également. Un grand merci tout particulier à Christophe, Benjamin, Emmanuel, et Julie. Cette dernière année, vous m'avez donné l'occasion d'enseigner l'immunologie à vos côtés, et d'apprendre énormément parmi vous : je vous remercie de m'avoir accordé une telle confiance ! Je n'oublie certainement pas Annie qui nous a accompagné dans les expérimentations animales dans la joie et la bonne humeur, sans jamais rien attendre en retour. Muriel, je ne t'oublie pas non plus : un grand merci pour ta bienveillance. Je pense aussi aux garçons, Maxime et Benjamin, qui sont là depuis peu mais finalement déjà bien intégrés dans notre quotidien, et avec qui on prend plaisir à manger des burgers.

Je remercie également le laboratoire de Toxicologie au Centre de Biologie Pathologie. Merci au Pr Delphine Allorge et au Dr Nicolas Beauval de m'avoir laissé manipuler seule sur l'ICP, et de m'avoir accompagné quand cela été nécessaire. Un grand merci aux techniciennes, présentes et passées (Delphine, Valérie, Coralie, Caroline, Céline, Linda) pour leur accueil si chaleureux et leur aide précieuse.

Sur le plan personnel, je remercie bien sûr ma famille qui m'a toujours soutenu dans mes projets. Surtout mes parents, pour avoir toujours cru en moi et poussé à aller au bout des choses : milles fois merci, je n'en serais pas là sans vous et votre soutien. A mon parrain, qui n'est plus là, mais qui serait tellement fier, je le sais. Un énorme merci à mes amies de la « Team Lille 1 », amies de fac devenues tellement plus ! Au « Power Rangers » dans leur intégralité aussi, même si certaines sont déjà citées : merci pour toutes ces soirées, pour toutes ces parties de rire à en pleurer, et toutes ces discussions, parfois très sérieuses. Parce que l'environnement amical autour d'un thésard est tellement important... Et une pensée pour mon petit chat, Nahla, pour son soutien indéfectible lors de l'écriture de ce manuscrit.

Et bien sûr, un dernier merci tout particulier à mon mari, Jordan, à mes côtés depuis si longtemps. Tu as su me rassurer, me soutenir, me pousser dans mes retranchements aussi quand il le fallait. Tu m'as fait grandir, et si j'en suis là aujourd'hui, c'est aussi grâce à toi.

« La plus belle réussite c'est de
ne pas lâcher prise »

William Dubois

Table des matières

Remerciements.....	3
Liste des abréviations.....	10
Avant-propos.....	12
Synthèse bibliographique.....	13
I. Les éléments-traces métalliques : un problème de santé publique	14
1. Le plomb	16
a. Les différentes sources d'expositions au plomb	16
b. Toxicocinétique	21
c. Effets toxiques observés	21
2. Le cadmium	23
a. Les différentes sources d'exposition au cadmium	23
b. Toxicocinétique	26
c. Effets toxiques observés	27
3. L'aluminium.....	28
a. Sources d'exposition à l'aluminium.....	28
b. Toxicocinétique	31
c. Effets toxiques observés	31
II. Les bactéries lactiques (BL) et autres bactéries du microbiote	34
1. Le microbiote intestinal	34
2. Les Bactéries lactiques (BL).....	37
a. Présentation des BL	37
b. Omniprésence des BL	39
c. Propriétés intéressantes des BL	41
3. Les Propionibactéries.....	46
III. La dépollution des ETM	48
1. L'assainissement des sols et matières inorganiques	48

2. La bioremédiation	49
3. Utilisation des bactéries pour la bioremédiation <i>in vivo</i>	50
a. La bioremédiation des xénobiotiques	50
b. La bioremédiation des ETM par les bactéries	51
Objectifs de la thèse	58
Chapitre 1 : <i>Criblage in vitro</i> de bactéries alimentaires et intestinales pour la bioremédiation des ETM	59
Matériel et méthodes	60
I. Souches et cultures bactériennes	60
II. Solutions de métaux et produits chimiques	63
III. Evaluation des concentrations minimales inhibitrices (CMI).....	63
IV. Courbes de croissance en présence des métaux	64
V. Evaluation des capacités de captation des métaux <i>in vitro</i>	65
VI. Dosage par ICP-MS	67
VII. Statistiques.....	67
Résultats expérimentaux	67
I. Evaluation de l'impact des métaux sur la viabilité des bactéries	67
1. Détermination des concentrations minimales inhibitrices des métaux	67
2. Evaluation de l'effet des métaux sur la croissance des bactéries en milieu liquide	68
II. Evaluation des capacités de captation des métaux	73
1. Capacités de chélation du Pb par les BL	73
2. Des différences de chélation du Pb très marquées au sein des Actinobactéries.....	75
3. Les Entérobactérales ont des capacités de biosorption moyennes du Pb	76
4. La capacité de chélation du Cd est phylum-, genre-, et souche-spécifique.....	78
5. Les capacités de chélation de l'Al sont aussi genre- et souche-spécifique.....	81
6. Les capacités de chélation des métaux peuvent être modulées en présence des autres ETM	81
Conclusion	87

Chapitre 2 : Evaluation des capacités de chélation <i>in vivo</i> de souches prometteuses sélectionnées <i>in vitro</i>	91
Caenorhabditis elegans : un modèle de laboratoire d'intérêt	92
Etudes de toxicité des métaux chez C. elegans	95
Matériel et méthodes	97
I. Expérimentation chez <i>Caenorhabditis elegans</i>	97
II. Expérimentations chez la souris.....	99
Résultats expérimentaux	100
I. Expérimentation chez <i>Caenorhabditis elegans</i>	100
1. Survie des vers N2 en présence de Pb et de Cd	100
2. Survie des vers PX627 en présence de Pb, Cd et Al.....	101
3. Effet du Cd sur la physiologie du vers PX627	102
4. Conclusion.....	103
II. Expérimentation chez la souris <i>Mus musculus</i>	105
Conclusion	110
Chapitre 3 : Effet du Tween 80 sur la capacité de chélation des métaux par les Propionibactéries...111	
Les détergents	112
La place des détergents dans notre étude	115
Matériel et méthodes	116
I. Évaluation de la capacité de captation du Pb par les bactéries en présence de détergents ..116	
II. Expériences de « rasage » <i>shaving</i>	116
III. Expérimentation animale.....	117
Résultats expérimentaux	117
I. La capacité de captation du Pb des <i>Propionibacterium</i> est <i>décuplée</i> en présence de Tween 80 117	
II. L'effet du Tween 80 est valable extemporanément	120
III. L'effet du Tween 80 est rapide, durable et généralisable à d'autres détergents	122
IV. L'effet du Tween 80 modifie les propriétés de surface des bactéries.....	124

V. Evaluation de l'efficacité <i>in vivo</i> de la chélation du Pb par des <i>Propionibacterium</i>	130
Conclusion	133
Discussion générale et perspectives du travail	135
Bibliographie	143
Annexes.....	168

Liste des abréviations

AFM : *Atomic Force Microscopy*

Al : Aluminium

ANSM : Agence Nationale de sécurité du Médicament et des produits de Santé

ATSDR : *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*

BL : Bactérie lactique

Ca : Calcium

Cd : Cadmium

CE50 : Concentration Efficace Médiane

CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer

CL50 : Concentration Létale Médiane

CMR : Cancérogène Mutagène Reprotoxique

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

DHT : Dose Hebdomadaire Tolérable

DL50 : Dose Létale Médiane

EcN : *Escherichia coli* Nissle

EFSA : *European Food Safety Authority*

ETM : Elément-trace métallique

GRAS : *Generally Regarded As Safe*

HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

HFD : *High Fat Diet*

HM : *Heavy Metals*

ICP-MS : *Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry*

LAB : *Lactic Acid Bacteria*

MEB : Microscopie Electronique à Balayage

MET : Microscopie Electronique à Transmission

OGM : Organisme Génétiquement Modifié

Pb : Plomb

p.c. : poids corporel

ppb : partie par milliard ($\mu\text{g}/\text{kg}$ ou $\mu\text{g}/\text{L}$)

ppm : partie par million (mg/kg ou mg/L)

QPS : *Qualified Presumption of Safety*

SDS : Dodecylsulfate de Sodium

TDS : *Total Diet Study*

ZO-1 et -2 : *zonula occludens* 1 et 2

Avant-propos

Compte-tenu du caractère pluridisciplinaire de ce travail de thèse, des choix délibérés ont été faits pour aborder de manière plus ou moins approfondie les différents contextes thématiques et méthodologiques. Ainsi, une attention particulière a été mise sur les bactéries lactiques en général, et celles du genre *Lactobacillus* de manière privilégiée, justifiant la présentation détaillée de ce groupe dans la **synthèse bibliographique**, ayant fait par ailleurs l'objet d'un article de revue.

A noter que pour faciliter la lecture du manuscrit et les correspondances avec les articles cités, l'ancienne nomenclature des lactobacilles a été conservée, bien que la transition ait eu lieu au printemps 2020 (Zheng et al., 2020).

Au cours de cette étude, nous avons évalué *in vitro* les capacités de chélation du plomb, du cadmium et de l'aluminium d'une collection de 225 souches bactériennes d'origines très diverses, afin d'appréhender le pouvoir chélateur des bactéries intestinales dans sa globalité dans le **Chapitre 1**.

L'évaluation des capacités de bioremédiation *in vivo* a été dans un premier temps été envisagée dans un modèle simple. Le recours à l'utilisation du ver nématode *Caenorhabditis elegans* comme modèle d'évaluation a ainsi été exploré et sera succinctement présenté, bien que les résultats n'aient pas permis de conclure en l'état sur la relevance de ce modèle. L'évaluation des capacités de fixation du plomb en situation d'exposition aigüe a également été réalisée dans un modèle murin. Ces approches *in vivo* constituent le **Chapitre 2**.

Par ailleurs, de façon quelque peu fortuite, durant le *criblage in vitro* de notre collection, un effet particulier du Tween 80 sur le potentiel chélateur des bactéries du genre *Propionibacterium* vis-à-vis du plomb a été mis en évidence. Une partie exploratoire de cet effet est développée dans le dernier chapitre de cette thèse, **Chapitre 3**.

Pour chacun de ces trois chapitres de développements expérimentaux, des compléments de contexte ont été introduits sous forme de préambules avant les descriptions méthodologiques et les résultats respectifs et conclusions associées, avant de restituer une **discussion générale** et des perspectives intégrées.

Synthèse bibliographique

I. Les éléments-traces métalliques : un problème de santé publique

La notion d'élément-trace métallique (ETM) a été récemment proposée pour remplacer le terme de « métaux lourds » qui était mal défini, et surtout généralement mal employé (Pourret, 2018). En effet, il regroupait des métaux réellement lourds, c'est-à-dire de masse volumique supérieure à 5 000 kg/m³, et d'autres métalloïdes de masse volumique moindre (Tableau 1).

Tableau 1 Liste des éléments-traces métalliques, leur abréviation et leur masse volumique à 20 °C.

Élément-trace métallique	Abréviation	Masse volumique à 20°C	Élément-trace métallique	Abréviation	Masse volumique
Aluminium	Al	2700 g/L	Iode	I	4940 g/L
Arsenic	As	5720 g/L	Manganèse	Mn	7440 g/L
Bore	B	2460 g/L	Mercure	Hg	13550 g/L
Cadmium	Cd	8640 g/L	Molybdène	Mo	10280 g/L
Cuivre	Cu	8920 g/L	Nickel	Ni	8910 g/L
Chrome	Cr	7140 g/L	Plomb	Pb	11340 g/L
Cobalt	Co	8890 g/L	Sélénium	Se	4820 g/L
Fer	Fe	7870 g/L	Silicium	Si	2330 g/L
Fluor	F	1580 g/L	Zinc	Zn	7140 g/L

Certains ETM sont indispensables à faibles doses, comme le fer ou le zinc, qui sont essentiels à la bonne conformation ou activation des protéines : on parle d'oligo-éléments. Mais au-delà d'un certain seuil, ils peuvent devenir toxiques, cette toxicité étant essentiellement dépendante de la forme chimique du métal, appelée spéciation, ainsi que de facteurs environnementaux (par exemple le pH du milieu) (Babich *et al.*, 1980). D'autres, n'ayant aucune fonction connue pour l'organisme, sont toujours toxiques, même à très faible dose, de façon directe ou indirecte, en perturbant les réponses physiologiques des organes vitaux ainsi que l'équilibre des métaux essentiels. Ainsi, le plomb (Pb), le cadmium (Cd), le mercure (Hg) et l'arsenic (As) comptent parmi les métaux les plus préoccupants selon les agences nationales et européennes (ANSES, EAT2, 2011 ; EFSA, 2012a, b; Santé Publique France, 2017). L'aluminium, contaminant métallique fréquemment retrouvé dans l'alimentation, semble également être délétère (Pineton de Chambrun *et al.*, 2012). Ces contaminants entrent dans l'organisme par deux voies principales : l'inhalation et l'ingestion. Il existe diverses sources

d'expositions aux contaminants métalliques, comme l'environnement domestique, l'environnement professionnel, l'alimentation etc... (Figure 1) Les ETM, massivement rejetés dans l'environnement *via* les activités anthropiques, sont persistants. Pour certains, ils restent rémanents dans l'environnement bien que métabolisés. Par exemple, le mercure s'accumule tout au long de la chaîne alimentaire, et se retrouve ainsi parfois en très forte concentration dans les aliments et sous sa forme la plus toxique, le méthyl-mercure.

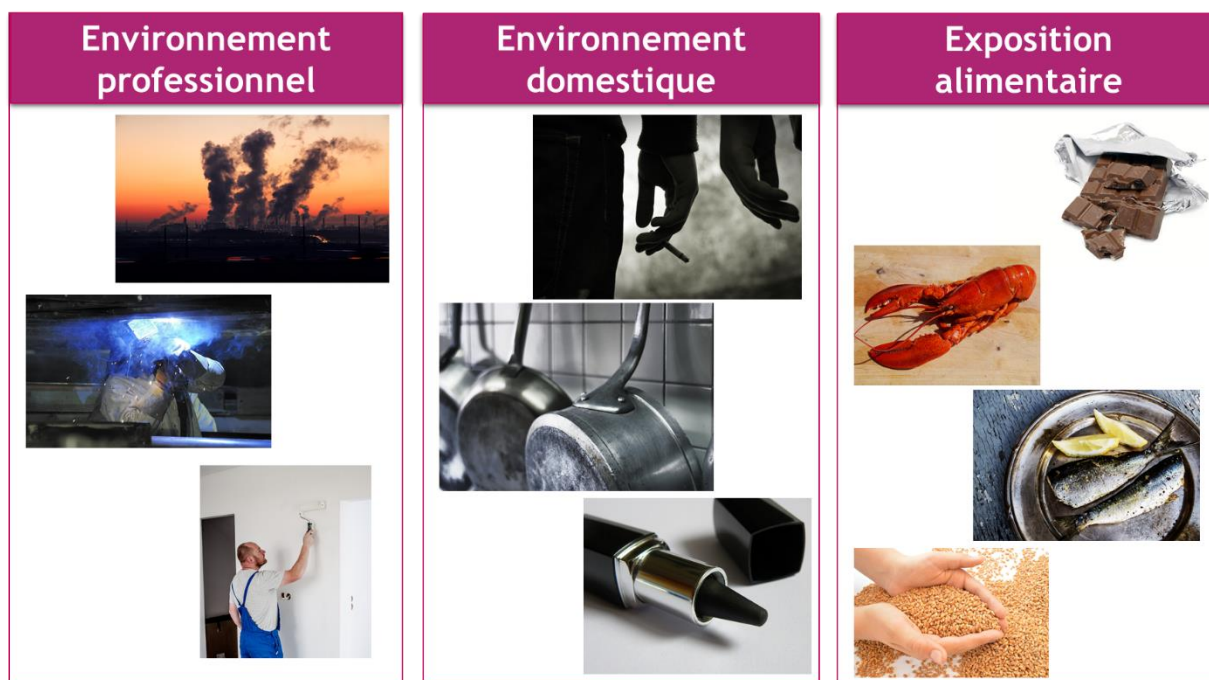


Figure 1 Les différentes sources d'exposition aux ETM. Il existe principalement 3 types d'expositions : professionnelle (pollution par les fumées, peintures etc...), domestique (cigarette, ustensiles de cuisine, maquillage etc...), et alimentaire (principalement les poissons et produits de la mer, céréales). Images libres de droit.

Des populations à risques ont pu être identifiées comme les enfants et les femmes enceintes qui sont particulièrement vulnérables face aux intoxications. Par ailleurs, les travailleurs exposés doivent également être particulièrement surveillés. Pour cela, il existe des doses et des seuils reconnus, différents pour chaque métal, permettant d'évaluer le niveau de l'exposition et les mesures à prendre en conséquence. Dans le cadre d'une surveillance professionnelle, ils peuvent être inscrits dans le code du travail. Réglementairement, en France, la VLB (ou Valeur Limite Biologique) correspond à la « limite de concentration dans le milieu biologique approprié de l'agent concerné, de ses métabolites ou d'un indicateur d'effet ». A l'heure actuelle, seul le plomb est concerné par cette VLB (Institut National de Recherche et de Sécurité, 2020). Cette réglementation repose également sur les VLB fixée par l'ANSES (Agence Nationale de Sécurité sanitaire de l'Alimentation), qui s'appuie sur des données soit

scientifiques de cause à effet d'exposition à l'agent chimique, soit sur des doses supposées attendues lors d'une exposition de 8 heures par jour pendant 5 jours (ANSES, 2019). Des entités internationales et européennes, comme le RAC (*Committee for Risk Assessment*), ont un rôle similaire.

D'autres valeurs sont quant à elle fixées pour la population générale. On distingue alors deux types de valeurs : des valeurs d'imprégnation de la population générale et des valeurs dites préoccupantes pour la santé humaine. Dans le premier cas, l'ANSES définit par exemple la VBR (Valeur Biologique de Référence). Elle est calculée sur la base d'étude des concentrations retrouvées dans la population générale française, comprenant des travailleurs mais non exposés à l'agent chimique. Mais d'autres seuils, notamment définis par la Commission Nationale de Biosurveillance allemande, sont définis comme étant des doses nécessitant une action correctrice : ce sont les HBM (*Human Biomonitoring values*). La HBM-I représente le seuil au-delà duquel des contrôles fréquents doivent être effectués, mais les données scientifiques actuelles ne permettent pas d'affirmer un réel impact sur la santé. La HBM-II représente le seuil critique au-delà duquel des mesures sont prises pour réduire l'exposition à l'agent chimique considéré, car il majore les risques de dommages pour la santé dans la population générale. La DHT (Dose Hebdomadaire Tolérable) représente quant à elle la quantité de métal pouvant être ingérée par semaine tout au long d'une vie sans qu'aucun dommage sur la santé ne puisse être observé.

1. Le plomb

Le plomb est l'un des trois contaminants les plus toxiques et les plus fréquents dans notre environnement, avec le mercure et le cadmium. L'OMS le classe ainsi parmi les dix produits chimiques les plus préoccupants pour la santé publique et appelle les Etats Membres à protéger les travailleurs, les enfants et femmes enceintes de l'exposition à ce métal.

a. Les différentes sources d'expositions au plomb

Exposition professionnelle au plomb

Il existe de nombreux sites d'extractions de plomb, dont les plus grands gisements se trouvent au Canada et aux Etats-Unis, ou encore en Suède et en Pologne. La France a, quant à elle, fermé son dernier site d'exploitation en 1991 dans le Gard. Le plomb possède la particularité d'être particulièrement malléable, épousant la forme du support sur lequel il est déposé. De plus, en se recouvrant d'un film protecteur lui donnant sa teinte grisée, il est l'un des métaux les plus résistants à

la corrosion (INRS, 2020). Le plomb est ainsi utilisé dans de nombreuses activités anthropiques. Dans les minerais, il est très souvent associé au zinc qui est alors récupéré dans les procédés de métallurgie. Il est également souvent associé à l'argent. Ainsi, on considère que l'exploitation d'une tonne de plomb peut engendrer l'extraction de 2 tonnes de zinc et de 3 kg d'argent. Il entre dans la fabrication et le recyclage des batteries électriques, notamment automobiles, dont l'utilisation est en pleine expansion ces dernières années. Il entre dans la composition des alliages de soudure, notamment pour les soudures à l'étain (63 % d'étain mélangé à 37 % de plomb), et était également autrefois utilisé pour la fabrication des vitraux et peintures, avant son interdiction d'utilisation en 1948 pour les travaux de peinture en bâtiment. Son large emploi dans le milieu professionnel induit ainsi une source d'exposition importante pour de nombreux travailleurs (INRS, 2020).

Exposition domestique au plomb

Outre les expositions professionnelles, le plomb est un métal auquel nous sommes tous exposés dans notre vie quotidienne. Il a certes fait l'objet d'une interdiction d'utilisation dans les peintures en 1948 pour les travaux du bâtiment, mais ce n'est qu'en 1993 que la loi a totalement interdit la commercialisation de peintures plombées. L'ingestion et l'inhalation de particules de peintures lors de travaux de rénovation est un risque d'exposition non négligeable. De plus, des cas de saturnisme sont rapportés chez des enfants vivant dans des logements insalubres où les peintures abimées s'écailent, mettant à nu la/les couche(s) d'origine souvent plombée. Cette présence de plomb dans les peintures est une réelle problématique de santé publique, car au-delà des peintures destinées aux logements et infrastructures, du plomb est également parfois retrouvé dans les peintures utilisées pour les jouets. En 2007, le groupe international Mattel a rappelé plus de 20 millions de jouets en raison d'une concentration trop élevée en plomb dans les peintures de ses jouets (Le Monde, 2007 ; Le Journal de l'Environnement, 2007). Afin de prévenir ces intoxications au plomb *via* les peintures de tous types, l'OMS a décidé de mettre en place l'Alliance mondiale pour l'élimination des peintures au plomb, conjointement avec les Nations-Unies (OMS et UNEP, 2012). Dans leurs textes, ces organisations visent les peintures au plomb au sens large, les décrivant comme « les vernis, les laques, les teintures, les émaux, les enduits vitrifiés, les apprêts et les revêtements, quelle que soit l'utilisation à laquelle ils sont destinés ».

Selon l'EFSA, l'exposition des enfants est supérieure à celle des adultes (1,03-1,32 µg/kg p.c./j contre 0,5 µg/kg p.c./j) (EFSA, 2012b), ce qui est préoccupant car les enfants sont davantage sujets à des formes graves de saturnisme. Leur propension à porter à la bouche tous ce qui se trouve à leur portée

augmente encore leur risque d'exposition comparé à un adulte, car ils augmentent ainsi leur exposition à des particules de peintures ou de la terre/poussière contaminée par exemple.

Exposition d'origine alimentaire

L'alimentation est une source importante d'exposition chronique au plomb, notamment à cause de la contamination des aliments cultivés sur des sols contaminés. Une étude menée en France a montré que les aliments contenant les taux de plomb les plus élevés étaient les crustacés, les mollusques et le chocolat (ANSES, EAT2 2011). Une étude plus large menée en Europe a montré que les céréales et les produits laitiers sont les principales sources d'exposition au plomb (EFSA, 2012b) (Figure 2).

La consommation de gibier peut également être une source d'exposition soit directement, en ingérant par mégarde des billes de plomb lors des repas, soit parce que le gibier a lui-même ingéré ces billes de plomb tombées sur le sol. L'utilisation de cartouches contenant du plomb a ainsi été incriminée dans les cas d'intoxications des populations de chasseurs. Depuis 2005, en France, ce type de cartouches est interdit pour une utilisation en zone humide, et devrait donc représenter une contamination de moins en moins fréquente dans les années à venir (Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable Français, 2006). La contamination des sols peut également provenir de sa présence naturelle, qui a tendance à être plus importante dans les sols érodés, mais aussi à la contamination de l'air par les particules émises par les carburants qui finissent par se déposer sur les surfaces. Cette dernière source a tendance à baisser ces dernières années grâce à la commercialisation d'une essence de substitution dans les années 1990, et à l'interdiction de l'utilisation de l'essence plombée pour les véhicules de loisir depuis 2000 (Sénat Français, consulté en Février 2021) (Figure 3), même si l'utilisation de carburant plombé pour l'aviation est encore autorisée dans 3 pays au monde (Algérie, Yémen, Iraq). Une autre voie d'exposition dans l'environnement domestique passe par l'ingestion d'eau du robinet contaminée. Même si les gouvernements, notamment français, tentent de réduire au maximum l'exposition de leurs concitoyens, elle persiste. En effet, en 2013, la limite réglementaire de la teneur en plomb dans l'eau courante est passée de 25 µg/L à 10 µg/L (Ministère des Solidarités et de la Santé, 2019). Les canalisations publiques font l'objet de rénovations, permettant ainsi de réduire le nombre d'installations en plomb, mais les canalisations domestiques un peu vétustes peuvent constituer une source de contamination. Le plomb étant également utilisé dans la fabrication des verres et contenant de boissons en cristal, le métal peut ainsi contaminer les alcools forts ou les boissons acides. Afin de développer les arômes du vin, rouge notamment, il est d'usage de le laisser décanter dans des carafes, parfois en cristal. Or, une étude menée en 1991 montre que la concentration en plomb du vin peut augmenter fortement au cours du temps selon le contenant en cristal utilisé (Graziano et Blum, 1991) (Figure 4).

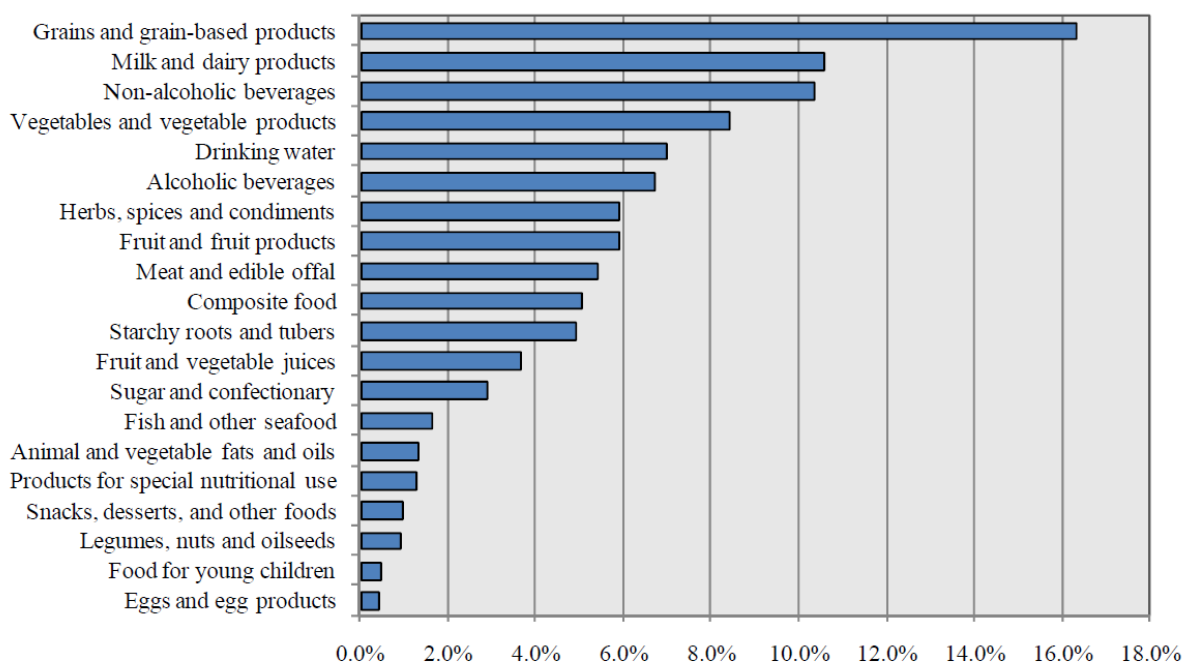


Figure 2 Contribution relative de 20 catégories d'aliments à l'exposition au plomb en Europe (European Food Safety Authority, 2012)

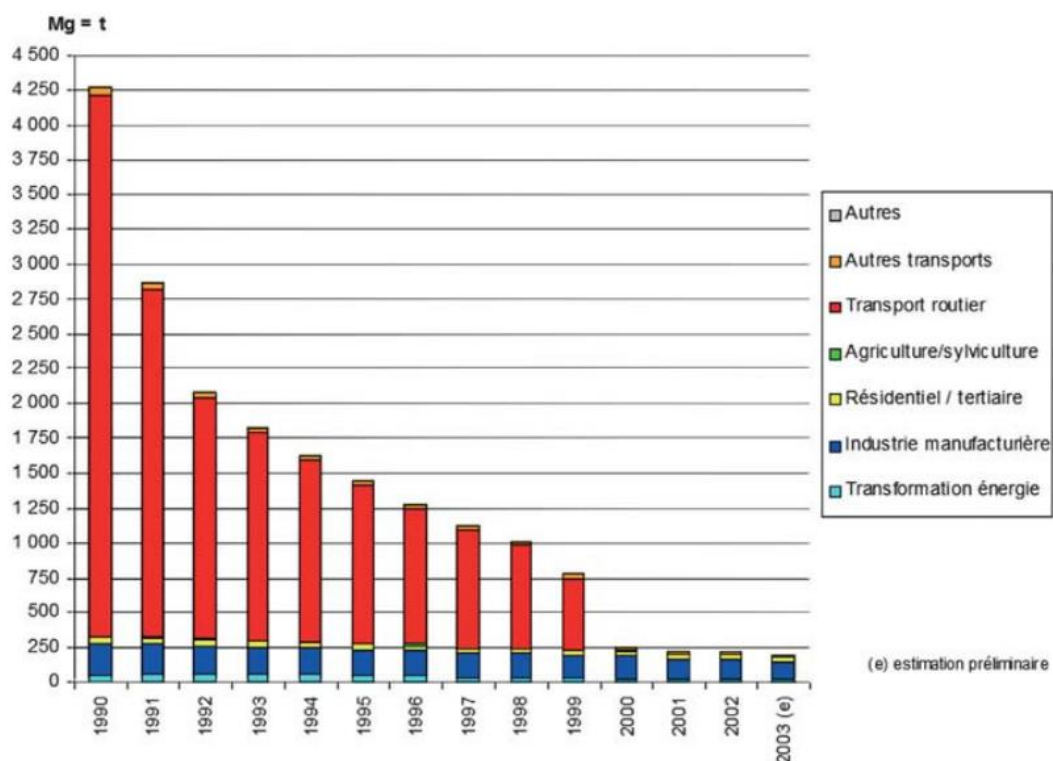


Figure 3 Contribution relative de 20 catégories d'aliments à l'exposition au plomb en Europe (European Food Safety Authority, 2012) Emissions de plomb dans l'air en France Métropolitaine de 1990 à 2003 (Sénat Français, consulté en Février 2021)

Autres sources d'exposition

Dans certains cas, des intoxications au plomb sont retrouvées lors de l'utilisation de maquillages comme les khôls, qui utilisent la galène comme pigment noir depuis l'Égypte ancienne et qui sont encore aujourd'hui parfois fortement contaminés par le plomb (De Caluwé, 2009 ; Filella *et al.*, 2020). De Caluwé montrent en 2009, sur la base d'une étude réalisée en 2000 à Bruxelles, que certains khôls (commerciaux ou artisanaux) peuvent contenir jusqu'à 78,6 % de Pb.

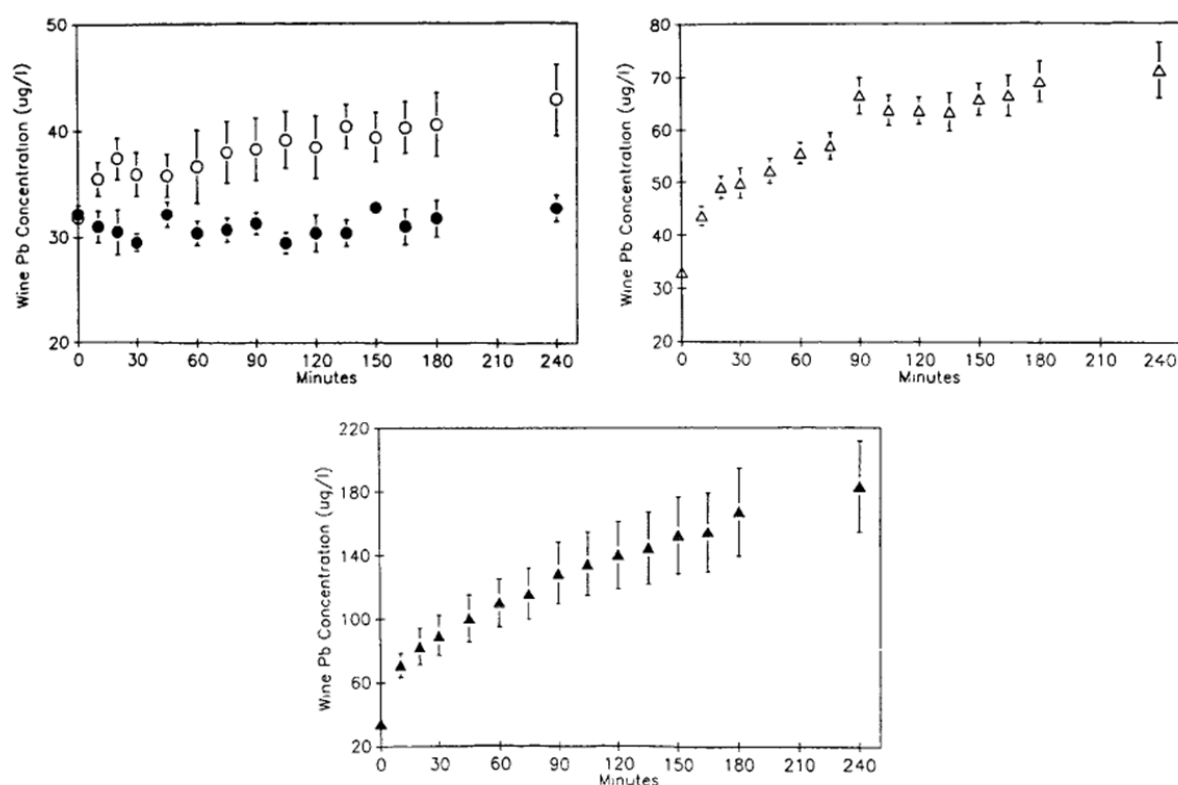


Figure 4 Moyenne des concentrations en Pb dans le vin conservé dans des carafes en cristal de différentes origines. Cristal sans Pb (●), cristal irlandais contenant 32 % de Pb (○), cristal français contenant 24 % de Pb (△) et cristal yougoslave (concentration inconnue en Pb) (▲). (Graziano et Blum, 1991)

Le tabac représente également une source d'exposition importante pour les fumeurs. Fresquez *et al.* (2013) ont montré qu'une cigarette contient entre 0,6 et 1,16 µg de plomb par gramme de tabac. Le plomb se retrouve dans les cigarettes car les feuilles de tabac, ayant poussé sur des sols contaminés, en contiennent elles-mêmes (King et Hajjar, 1990).

b. Toxicocinétique

Le plomb entre dans l'organisme *via* deux grandes voies d'exposition : l'ingestion et l'inhalation.

L'**absorption** du plomb se fait majoritairement par la voie digestive. L'ingestion du plomb peut se faire par l'alimentation et l'eau de boisson, mais peut aussi être due au passage de particules de plomb initialement inhalées dans la voie digestive *via* la clairance mucociliaire bronchique. Le plomb inhalé peut ainsi être soit absorbé par les alvéoles pulmonaires, soit être redirigé vers le système digestif (INRS, Fiches Biotox) si les particules ont un diamètre supérieur à 5 µm. Une fois dans l'appareil digestif il est absorbé au niveau intestinal, avec une grande variabilité selon l'âge. En effet, chez un adulte en bonne santé, 3 à 15 % de la quantité totale de plomb ingérée est absorbée. Elle peut atteindre 50 % chez les enfants, dont l'absorption intestinale du plomb est 4 à 5 fois plus élevée que celle d'un adulte (Ziegler *et al.*, 1978 ; Mushak, 1991). Le plomb se **distribue** ensuite dans les organes *via* la circulation sanguine, et s'accumule au fil du temps. Il se retrouve ainsi dans le cerveau, les reins, le foie, et principalement les os où 80 à 95 % du plomb absorbé se fixe (Alfven *et al.*, 2002). L'**élimination** du plomb est très longue. En effet, sa demi-vie est d'une centaine de jours dans le sang, et jusqu'à 20 à 25 ans dans les os. La majorité du plomb absorbé et non stocké dans l'organisme est filtré au niveau du rein pour être éliminé dans les urines (Anses, 2013).

Lors de certains événements de la vie, comme lors d'une grossesse ou d'une fracture, ou de certaines maladies comme l'ostéoporose, il peut y avoir un relargage massif de ce métal dans l'organisme : le taux plasmatique du plomb ne reflète donc pas forcément l'exposition à l'instant donné. Certains régimes (riches en graisses notamment), ou certaines carences (en calcium ou vitamine D) peuvent augmenter l'absorption intestinale du plomb et donc l'exposition à ce contaminant (Ros et Mwanri, 2003 ; Yildiz *et al.*, 2018).

c. Effets toxiques observés

La toxicité du plomb est essentiellement chronique. Chez l'**adulte**, elle peut conduire à des anémies, notamment chez les travailleurs exposés, à cause de son entrée en compétition avec le fer pour les systèmes de transport (Fowler *et al.*, 1980). Le plomb agit entre autres sur la synthèse de l'hème, et donc de l'hémoglobine, en inhibant des enzymes essentielles à ce mécanisme (INRS, 2020). De plus, il agirait également sur la membrane des globules rouges, les rendant plus fragiles, ce qui peut conduire dans certains cas à une hémolyse (*Agency for Toxic Substances and Disease Registry*, 2012). Des convulsions peuvent être observées dans les cas les plus graves. D'autres symptômes, généralement peu alarmants, sont également décrits : céphalées, vomissements, douleurs abdominales voire coliques (requalifiées de saturnines une fois l'étiologie identifiée), fatigue...

Chez l'**enfant**, la toxicité est particulièrement délétère et peut altérer le développement cérébral, entraînant ainsi une baisse du quotient intellectuel. Ainsi, Lanphear *et al.* ont montré sur la base d'une méta-analyse de 7 études que la plombémie, inférieure à 100 µg/L, pouvait être significativement corrélée à des baisses du QI chez des enfants de 5 à 10 ans (Lanphear *et al.*, 2005). Ainsi, l'*Institute for Health Metrics and Evaluation* (IHME) a estimé que 12,4 % des cas de déficience du développement intellectuel idiopathique pouvaient être imputés à une exposition chronique au plomb. Une étude de 2009 menée sur des enfants afro-américains a montré une diminution de 5 à 25 points de QI selon le niveau d'exposition, même à une faible dose de 5 µg/dL de sang (Min *et al.*, 2009).

Selon l'OMS, la DHT pour le plomb est fixée à 25 µg/kg de poids corporel pour un adulte, soit environ 3,6 µg/kg p.c./j. Malgré tout, en 2011, un nouveau rapport prenant en compte les études citées précédemment, notant des diminutions de quotient intellectuel significatives chez les enfants, ainsi qu'une hausse de la pression artérielle chez les adultes, pose la question de la DHT en vigueur (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*, 2011). De nos jours, on considère ainsi qu'il n'existe pas de plombémie (concentration sanguine en plomb) qui ne soit pas dangereuse pour la santé, des études récentes prouvant qu'une plombémie même <100 µg/L est susceptible d'altérer de nombreux systèmes biologiques (Bellinger, 2008 ; Liu *et al.*, 2013 ; Anses, 2013), sans pour autant que l'individu ne présente de symptômes particuliers. Chez la femme enceinte, une exposition avérée mais avec des plombémies faibles (< 100 µg/L) est corrélée à des faibles poids à la naissance, et un risque de fausse couche accru (NTP, 2012).

La toxicité aigüe du plomb peut avoir de lourdes conséquences. Elle survient généralement suite à une ingestion massive de plomb. Dans les heures qui suivent, des troubles digestifs apparaissent généralement, de façon plus ou moins prononcée (douleurs, vomissements, diarrhées). Des atteintes rénales peuvent également avoir lieu. Dans les cas d'intoxications très sévères, il peut y avoir une atteinte du système nerveux central, parfois irréversible, pouvant entraîner le coma ou la mort (Ministère des Solidarités et de la Santé, 2002).

Les femmes enceintes et allaitantes, ainsi que le fœtus, sont particulièrement à risque d'intoxications au plomb. En effet d'une part, au cours de la grossesse, le développement du squelette fœtal nécessite une augmentation de l'absorption intestinale du calcium, et un remodelage du tissu osseux (Debiais, 2020). Cette mobilisation osseuse induit un relargage de plomb dans le sang (Gulson *et al.*, 1997 ; Téllez-Rojo *et al.*, 2004), qui peut être une cause d'intoxication aigüe de la mère (Riess et Halm, 2007). D'autre part, cette augmentation du taux de plomb circulant chez la mère est dangereuse pour le fœtus : cela induit une exposition prénatale de l'enfant, le plomb passant la barrière placentaire à partir de la 12^{ème} semaine de grossesse (Al-Saleh *et al.*, 2010). Le problème est également retrouvé lors

de la lactation, qui demande également une remobilisation du calcium osseux de la mère pour le lait. Le lait peut contenir une concentration en plomb jusqu'à 50 % de la plombémie de la mère (INRS). Les enfants ayant une absorption intestinale plus forte que les adultes, le lait maternel contaminé en plomb est donc un réel risque d'exposition chez le nourrisson.

Par manque de preuves évidentes, le CIRC a classé le plomb en tant que carcinogène probable pour l'humain (Groupe 2A) en 2006, et toxique pour la reproduction (Groupe 1A) ce qui lui vaut d'être classé comme CMR.

2. Le cadmium

Le cadmium est un métal naturellement présent dans l'environnement. Son utilisation fréquente dans l'industrie, et son relargage dans l'environnement par divers procédés en font un ETM omniprésent et pourtant particulièrement toxique. Il est ainsi classé au 7^{ème} rang mondial des dangers chimiques environnementaux de l'*Agency for Toxic Substances and Disease Registry* du gouvernement américain (ATSDR, 2012).

a. Les différentes sources d'exposition au cadmium

Exposition professionnelle

Le cadmium est un métal malléable comme le plomb, dans une moindre mesure. Au contact de l'air, il se ternit mais est peu corrodé même par l'eau de mer. Ainsi, le Cd est beaucoup utilisé dans les alliages ou dans le procédé dit de cadmiage, qui consiste en un dépôt en fine couche de Cd sur l'acier, visant à protéger le protéger de la corrosion (INRS, 2019). Tous ces avantages en font un métal très utilisé dans l'industrie, même si son utilisation est de plus en plus réglementée depuis son classement en CMR (CIRC, 1993).

Le cadmium est un métal très réactif, donc rarement retrouvé seul mais souvent en combinaison avec des minerais comme le zinc, le cuivre ou encore le plomb (INERIS, 2011). Les minerais de zinc contiendraient environ 0,3 % de cadmium (*Nordic Council of Minister*, 2003). Lors des procédés de métallurgie du zinc par exemple, il est facilement récupérable par filtration des gaz car très volatil. Il entre également dans la composition de certaines batteries électriques, couplé au nickel, et peut être recouvré lors du recyclage de ces dernières. En France, il existe de grosses usines spécialisées dans ce type de recyclage, notamment Veolia dans son usine de Dieuze dans la Moselle, ou la Société Nouvelle d'Affinage des Métaux qui possède deux usines en France dans l'Aveyron et l'Isère. Ainsi, la SNAM a permis de recycler 360 tonnes de Cd en 2016 dans les procédés de réhabilitation des batteries. En

revanche, les seules productions en France de ce métal proviennent du recyclage car la dernière exploitation minière fut fermée en 1993.

Exposition environnementale

Le cadmium est un métal ubiquitaire de la croûte terrestre (0,1 à 0,5 ppm). Il est naturellement libéré dans l'environnement par l'érosion de la roche, mais également lors d'éruptions volcaniques. La contamination de l'environnement peut également se faire par le biais des activités anthropiques citées précédemment, qui peuvent induire la libération de flux de déchets. De plus, certains engrais phosphatés sont également composés de cadmium (Bakshi *et al.*, 2018). Il se retrouve alors dans les sols et nappes phréatiques, et se concentre ensuite dans les végétaux (légumes et céréales) ayant poussé sur des sols acides, où sa biodisponibilité est augmentée, et dans les crustacés qui filtrent l'eau dans laquelle ils se développent (EFSA, 2012a). Ainsi, les expositions environnementales et alimentaires sont intimement imbriquées.

Exposition domestique

Dix pour cent des expositions domestiques sont réparties entre l'apport de cadmium par l'air ambiant (Vahter *et al.*, 1991) et l'eau (Olsson *et al.*, 2002). La valeur limite de concentration en Cd des eaux de consommation est fixée à 5 µg/L (Conseil des Communautés Européennes, 1980). Quatre-vingt-dix pourcents de l'exposition dans l'environnement domestique est alimentaire pour la population des non-fumeurs, et semble à la hausse. En effet, une première étude générale de la contamination de l'alimentation par des xénobiotiques (*Total Diet Study*) réalisée en 2000-2004 (Leblanc *et al.*, 2005) sur des paniers alimentaires de régimes variés a étudié la contamination des repas après leur préparation (incluant la cuisson des pâtes avec l'eau du robinet par exemple). Une étude similaire réalisée en 2007-2009 (Arnich *et al.*, 2012) a mis en évidence que la contamination en Cd de certains aliments a augmenté entre les deux études, et ce jusqu'à un facteur 80 pour certains aliments (80 pour le chocolat, 30 pour les sandwichs, snacks, pâtisseries, et 20 pour les biscuits). De par la contamination des végétaux en Cd, les végétariens deviennent une population grandissante à risque identifiée pour ce métal. Les apports alimentaires en Cd varient également en fonction de l'âge, en lien avec des changements de comportements alimentaires au cours du temps (Figure 5) (EFSA, 2012a).

Pour les fumeurs, la fumée de cigarette est la principale source d'exposition en comptant pour 75 % de l'apport quotidien. Le tabac contient ainsi du Cd à hauteur de 1,0 à 1,7 µg/g de tabac, soit environ 0,5 à 1 µg/cigarette (Fresquez *et al.*, 2013). Ainsi, les fumeurs ont un taux de Cd 4 à 5 fois plus élevé

dans le sang, et 2 à 3 fois plus élevé dans les reins que les non-fumeurs (Satarug et Moore, 2004). La masse totale de Cd retrouvée dans l'organisme après 50 ans d'exposition est en moyenne de 5 à 30 mg pour un non-fumeur, et augmente de 30 à 40 mg chez les fumeurs (INRS, 2019).

On retrouve également le cadmium dans les peintures et la fabrication de colorants (jaune et rouge), utilisés pour les matières plastiques, comme par exemple les gilets de sauvetage ou les casques de chantier. Dans les années 1990, son utilisation dans la fabrication de colorants a progressivement diminué car il a été reconnu comme métal toxique. Plus largement, son utilisation est réglementée par des directives européennes depuis 2006, visant à limiter les quantités de Cd utilisées aux seules utilisations où il ne peut pas être remplacé. Ainsi, l'utilisation de Cd pour les pigments est réduite à 9 % de la consommation mondiale de Cd ; le reste concernant son utilisation dans la métallurgie.

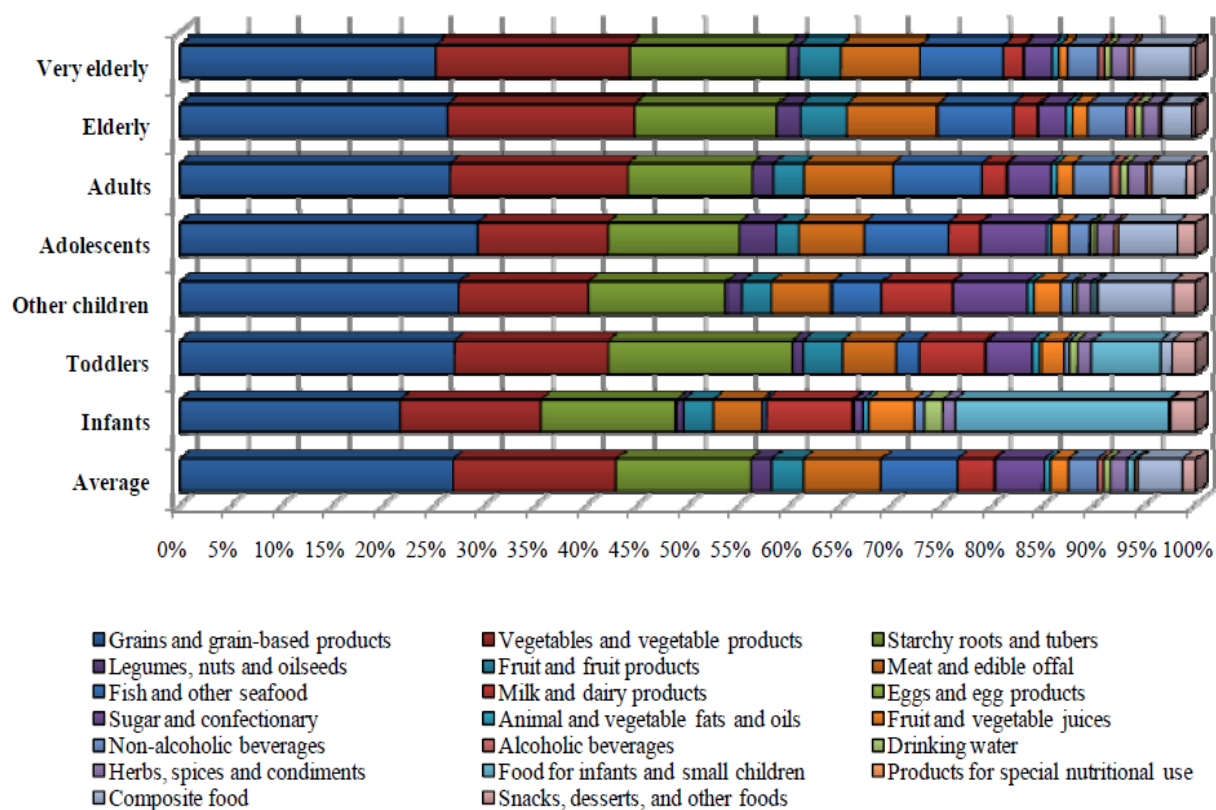


Figure 5 Contribution de 20 catégories d'aliments à l'exposition au Cd en Europe, en fonction des tranches d'âge (très âgés, âgés, adultes, adolescents, enfants, bambins, Bébés, et moyenne des âges) (European Food Safety Authority, 2012)

b. Toxicocinétique

A l'image du plomb, le cadmium fait partie des rares métaux à ne pas avoir de fonction connue pour l'organisme. Comme pour tous les autres contaminants, il y entre principalement *via* l'ingestion et/ou l'inhalation. L'**absorption** digestive du Cd est de l'ordre de 5 à 10 %, alors qu'elle est d'environ 50 % par voie pulmonaire (INRS, 2019). Une fois dans la circulation systémique, il se lie aux métallothionéines, à l'albumine ou encore aux érythrocytes. En raison des propriétés similaires des métaux, les régimes carencés, notamment en zinc, cuivre, fer ou calcium, augmentent le taux d'absorption du cadmium, et des métaux toxiques en général.

Le cadmium se **distribue** principalement et transitoirement dans le foie où il se lie à des protéines, elles-mêmes transportées au niveau rénal. Le rein est l'organe où il s'accumule majoritairement (30 à 50 % du cadmium total dans l'organisme), exerçant une néphrotoxicité même à faible dose.

La demi-vie d'**élimination** du cadmium est longue, d'une centaine de jours au niveau sanguin, à plusieurs années dans le rein et le foie (10 à 20 ans et 4 à 19 ans respectivement). Seulement 0,001 % du Cd absorbé est excrété chaque jour dans les urines. Il est en fait réabsorbé au niveau du glomérule rénal (INRS). Ainsi, la forte absorption combinée à la faible excrétion dans les urines, font de ce métal un élément toxique très cumulatif (Satarug et Moore, 2004).

Lors de la grossesse, la concentration en Cd retrouvée dans le cordon ombilical est environ deux fois plus faible que la concentration sanguine de la mère (Santé Publique France, 2017). Pour autant, il a été prouvé que cette exposition prénatale a des effets sur le poids à la naissance, diminue les apports de nutriments aux fœtus, créant entre autres des retards de développement fœtal (Kippler *et al.*, 2012 ; Geng et Wang, 2019), avec des effets différents selon le sexe de l'enfant (Geng et Wang, 2019 ; Young et Cai, 2020). Cette exposition prénatale pourrait avoir des effets à long terme sur la vie adulte. Young et Cai exposent un résumé d'une étude chez le rat (Hudson *et al.*, 2019) qui montre un effet de l'exposition *in utero* des ratons et des divers effets à la naissance et à l'âge adulte (2020) (Figure 6). Lors de l'allaitement, le cadmium peut également être transmis de la mère à l'enfant en faible quantité. Cinq à dix pourcents de la quantité de Cd sanguin de la mère est retrouvé dans le lait maternel (Truska *et al.*, 1989).

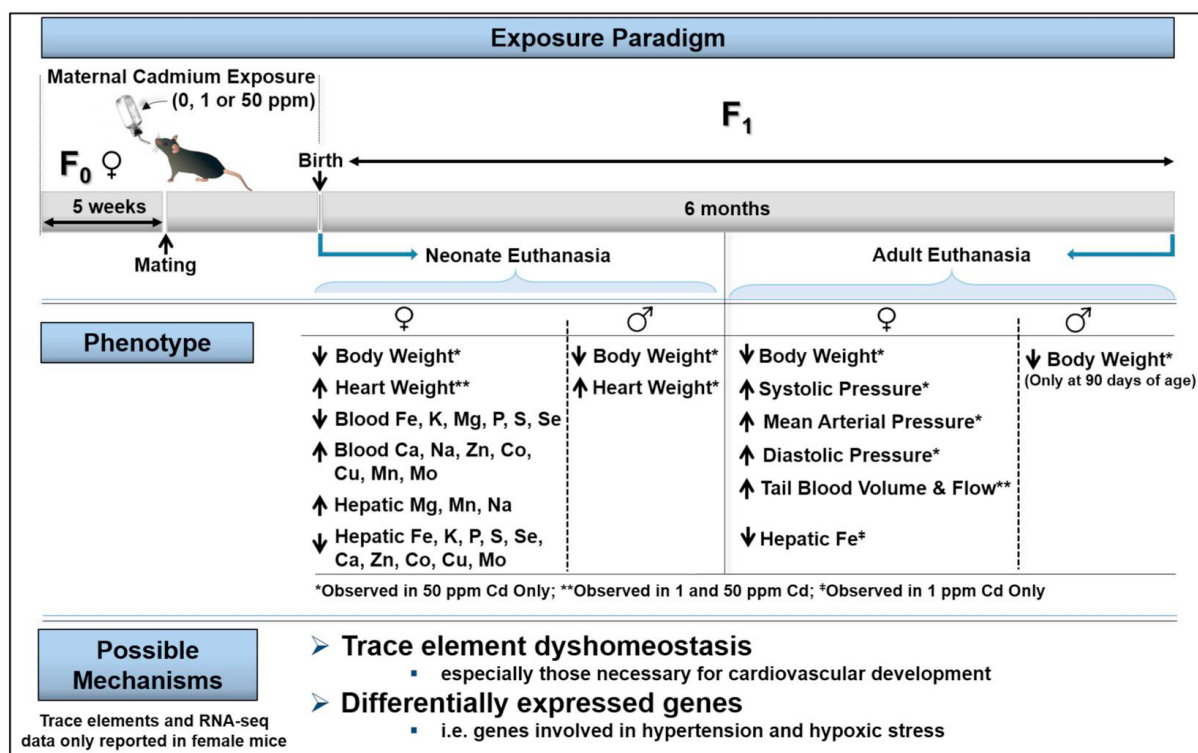


Figure 6 Résumé par Young et Cai (2020) des résultats de l'étude de Hudson *et al.* (2019). Les auteurs reprennent les phénotypes observés dans l'étude de 2019, ainsi que les mécanismes hypothétiques avancés par Hudson *et al.*

c. Effets toxiques observés

Dans le cas d'une intoxication aiguë au Cd par ingestion, l'effet émétique de celui-ci permet parfois au métal toxique d'être rapidement évacué de l'organisme. Les symptômes peu graves ressemblent à ceux d'une intoxication aiguë au plomb : vomissements, diarrhées, douleurs musculaires. Dans certains cas, une insuffisance rénale peut également survenir (INRS, 2019). En revanche, la toxicité aiguë par inhalation conduit au décès dans 15 à 20 % des cas (INERIS, 2011), précédé de manifestations pulmonaires (toux, douleurs thoraciques) à l'origine d'un œdème pulmonaire mortel (INRS, 2019).

La toxicité du Cd est également chronique. De par sa faible élimination, il est un toxique particulièrement cumulatif : les manifestations cliniques peuvent donc se développer bien après la fin de l'exposition. Des lésions rénales sont observées dès 50 µg de Cd par g de tissu, une concentration qui peut être atteinte après 50 ans d'une consommation de 0,001ppm/jour (Buchet *et al.*, 1990). En raison de sa ressemblance avec le Ca, il est réabsorbé à sa place au niveau rénal, induisant une fuite calcique dans les urines et une accumulation subséquente du Cd dans les os (Alfven *et al.*, 2002). Il y provoque alors des fragilités osseuses et des déformations : une des maladies connues imputable à une intoxication au Cd est la maladie Itai-Itai.

Plusieurs composés inorganiques du Cd induisent des cancers chez l'animal. Ces données, accompagnées par l'observation que l'exposition professionnelle au Cd augmente les risques de cancer du poumon et prostatique, lui a valu d'être classé comme CMR par le CIRC, dans la catégorie 1 des cancérigènes (1993 ; INRS, 2019).

Ainsi, la DHT pour le Cd définie par l'EFSA en 2009 est de 2,5 µg/kg poids corporel/semaine (EFSA, 2012a), qui était de 7µg/kg p.c./semaine jusqu'alors (WHO, 1989). La plupart des adultes en Europe sont exposés à des taux fleuretant avec la DHT de 2,04 µg/kg p.c./semaine (EFSA, 2012a), quantité augmentée à 4.85 µg/kg p.c./semaine en moyenne chez les bambins.

3. L'aluminium

Découvert en 1807, l'aluminium est le métal le plus abondant de la croûte terrestre, et globalement le 3^{ème} élément le plus abondant après l'oxygène et le silicium : il représente environ 8 % de la masse totale de la surface solide de la Terre. Métal ubiquitaire, ayant des propriétés chimiques très intéressantes pour de nombreuses industries, il est devenu incontournable et très répandu dans notre environnement. La forte exposition à laquelle est soumise une partie non négligeable de la population mondiale en fait un métal préoccupant pour la santé humaine.

a. Sources d'exposition à l'aluminium

Exposition professionnelle

Comme le plomb et le cadmium, l'aluminium est un élément particulièrement réactif, on le trouve ainsi rarement seul mais plutôt associé à d'autres éléments (INRS, 2014). Sa concentration dans les sols peut ainsi varier très largement, allant de 7 à 100 g/kg ou plus (EFSA, 2008). A l'image des deux métaux précédents, il s'auto-oxyde à l'air et se pare d'une couche de quelques nanomètres qui le protège de la corrosion. Très léger et résistant, il est devenu indispensable dans de nombreuses industries. Il est par exemple utilisé pour la fabrication des transports de tous types (aériens, terrestres ou marins), permettant de fabriquer des véhicules de plus en plus légers mais résistants (Liddicoat *et al.*, 2010), permettant ainsi de réduire la consommation de carburant tout en augmentant la charge utile. Son utilisation dans la construction du bâtiment est également en plein essor, utilisé dans la construction des portes/fenêtres, portails, profilés de verrière, balustrade etc... Les expositions professionnelles sont donc très variées.

Exposition domestique

Les principales sources d'exposition sont l'alimentation, et dans de moindres mesures l'utilisation de médicaments ou de cosmétiques, ou l'eau de boisson (EFSA, 2008). Les ustensiles de cuisine ainsi que les additifs alimentaires représentent une source de contamination très importante : l'aluminium est omniprésent dans nos cuisines. En Chine, la plupart des habitants dépassent la DHT conseillée pour l'Al qui est de 1 mg/kg p.c. (EFSA, 2011 ; Vignal *et al.*, 2016). (Tableau 2). Dans la 2^{ème} TDS (*Total Diet Study*), concernant la contamination des aliments par l'aluminium, il est à noter qu'en France les expositions des adultes et des enfants connaissent une hausse de 50 % et 40 % respectivement (Arnich *et al.*, 2012), comparativement à la 1^{ère} TDS (Leblanc *et al.*, 2005). Les principaux aliments contributeurs à cette exposition sont les produits céréaliers, les boissons chaudes et les légumes chez les adultes, et les produits céréaliers, les légumes et les produits laitiers chez les enfants (Vignal *et al.*, 2016) (Figure 7). En 2010, Burell et Exley concluent également à une forte exposition des enfants *via* la consommation de laits infantiles en poudre, y compris des laits certifiés biologiques (Burell et Exley, 2010). Leur conclusion est que tous les laits contiennent de l'aluminium à des concentrations comprises entre 0,4 et 0,63 mg/L, ce qui est deux à trois fois plus élevé que la limite autorisée dans l'eau du robinet. Cette contamination est probablement due à la combinaison entre l'aluminium contenu dans l'eau utilisée pour solubiliser les poudres de lait, et de la contamination de la poudre en elle-même. Quoiqu'il en soit, ces concentrations semblent alarmantes si on considère que ces laits sont destinés à des nourrissons.

Même si l'alimentation représente la plus grosse partie de l'exposition alimentaire, la contamination de l'eau peut également être problématique. Certaines villes rapportent jusqu'à 1 mg/L d'aluminium dans leur eau courante, fait principalement dû à l'utilisation de l'aluminium comme agent floculant et clarifiant, afin d'éliminer toute matière organique ou particules de l'eau (Igbowke *et al.*, 2019). La quantité d'Al dans l'eau de boisson à consommation humaine est limitée à 0,2 mg/L (ANSM, 2011), mais elle est considérée comme une source mineure d'exposition (EFSA, 2008) comparativement à l'alimentation.

L'utilisation de déodorants contenant de l'aluminium est un sujet à controverse ces dernières années. Même si elle a montré une forte baisse ces dernières années, elle reste une source potentielle d'exposition domestique à l'Al. Certains médicaments comme des antiacides utilisés contre les maux d'estomac peuvent également contenir jusqu'à 600 mg d'hydroxyde d'aluminium (ATSDR, 2012) puisqu'aucune réglementation n'existe sur la quantité maximale autorisée d'Al dans ce type de médicaments (ANSM, 2011). L'aluminium est également utilisé comme excipient des vaccins dans lesquels on le retrouve en quantité infime sous différentes formes (CDC, 2020).

Tableau 2 Taux moyens d'exposition à l'aluminium dans le monde pour différents pays (D'après Vignal *et al.*, 2016).

Pays	Exposition des adultes (mg/kg p.c./ semaine)	Exposition des enfants (mg/kg p.c./ semaine)
France	0,282	0,435
Italie	0,417	ND
Espagne	1,231	1,582
Royaume-Uni	0,497	1,085
Canada	0,873	ND
Etats-Unis	1,05	ND
Australie	0,252	0,308
Japon	0,3	0,553
Chine	1,263	3,302

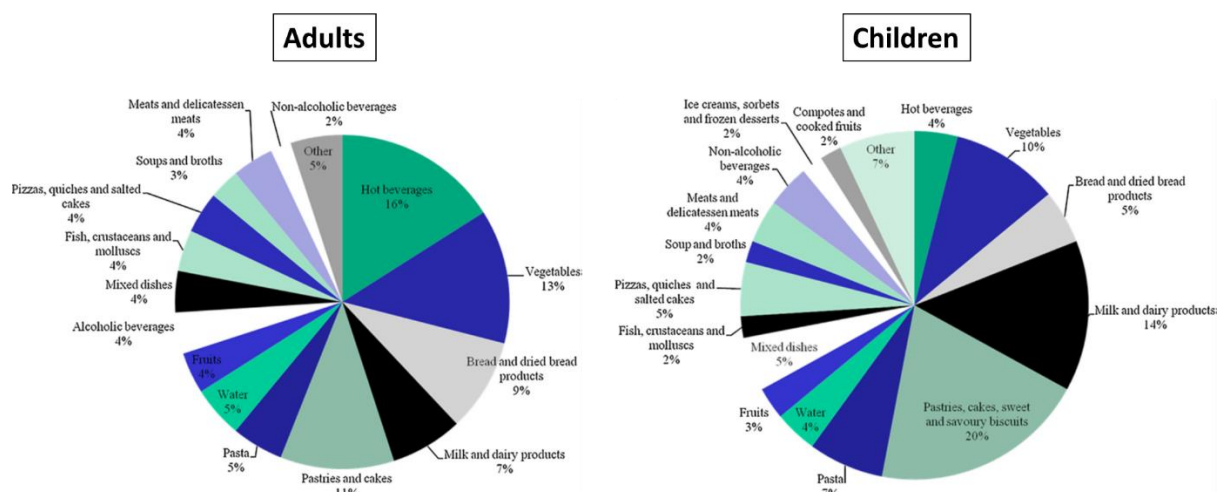


Figure 7 Contribution de différents groupes d'aliments à l'exposition à l'aluminium chez les adultes et chez les enfants (Vignal *et al.*, 2016).

b. Toxicocinétique

L'**absorption** intestinale de l'aluminium est faible (0,1 à 1 %) (INRS), l'absorption pulmonaire est légèrement plus élevée, 1 à 2 %, mais concerne principalement les expositions professionnelles. **Une fois dans la circulation sanguine**, il se lie préférentiellement à la transferrine et est transporté jusque dans les os, où 50 % de la quantité absorbée est stockée (INRS). La concentration en Al dans les os peut ainsi varier de 5 à 10 mg/kg (EFSA, 2008). Il peut aussi être stocké dans la rate et le foie qui sont des organes riches en récepteurs à transferrine. La voie d'**élimination** du métal dépend essentiellement de sa voie d'entrée : s'il est entré dans l'organisme par inhalation, son élimination est principalement urinaire. En revanche, s'il est entré par voie digestive, de par la faible absorption, il est principalement éliminé dans les fèces.

Chez un humain en bonne santé, on retrouve généralement 30 à 50 mg/kg d'aluminium (ATSDR, 2008), et la concentration sanguine est d'environ 1 à 3 µg/L (EFSA, 2008).

c. Effets toxiques observés

La DHT pour l'aluminium est fixée à 1 mg/kg p.c. Une grande partie de la population mondiale dépasserait ce seuil, avec des apports allant de 1,6 à 13 mg/j pour un adulte de 60 kg (EFSA, 2008).

Très peu de cas d'intoxications **aigües** à l'aluminium sont rapportées. Les seuls cas connus sont dus à un accident de déversement accidentel de 20 tonnes de sulfate d'aluminium dans un réseau d'eau en Angleterre (InVS, 2003). Les habitants ont présenté des éruptions cutanées et des troubles intestinaux. Cependant, ces données ne permettent pas de mettre clairement en cause l'aluminium dans ces manifestations cliniques mineures (InVS, 2003).

La toxicité **chronique** de l'Al se manifeste essentiellement au niveau du **système nerveux central** et des **tissus osseux**, même si de nombreux autres systèmes biologiques sont affectés (Kawahara et Kato-Negishi, 2011 ; Igboke *et al.*, 2019). La première observation de toxicité chez l'humain date de 1976 chez des patients dialysés qui présentaient des troubles neurologiques. Une décalcification fut également observée (Alfrey *et al.*, 1976), ainsi qu'une accumulation d'Al dans le cerveau. En plus d'utiliser des systèmes de dialyse fortement concentrés en Al, l'atteinte rénale des patients ne leur permettait pas d'éliminer suffisamment le métal. Aujourd'hui, ces troubles neurologiques, renommés « démence des dialysés », sont clairement imputables à l'aluminium des dialysats (InVS, 2003). Depuis, l'utilisation de l'eau pour les dilutions d'hémodialyse de ces systèmes est inscrite à la pharmacopée, européenne notamment, qui limite la teneur en Al à 10 µg/L (InVS, 2003). En 1994, Harrington et ses collaborateurs observent une accumulation d'aluminium dans les cerveaux de ces patients (Harrington

et al., 1994), avec des modifications des protéines Tau observées dans la substance grise, similaires à ce que l'on retrouve chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Ces observations sont corrélées à celles d'Edwardson *et al.* (1992) montrant des dépôts bêta-amyloïdes plus importants chez les patients dialysés. Ces études suggèrent que ce métal pourrait aussi être impliqué dans la maladie d'Alzheimer. Rondeau *et al.* (1999) ont suivi pendant huit ans l'état de santé d'environ 4 000 personnes, tout en surveillant le taux d'Al dans l'eau du robinet. Ils ont mis en évidence que, dans les communes où le taux d'Al dans l'eau dépassait 100 µg/L, les risques de développer la maladie d'Alzheimer étaient multipliés par 2. Une méta-analyse récente, basée sur 8 cohortes de 1996 à 2013 sur différents continents, trouve une association entre l'exposition à l'aluminium et un risque accru de développer la pathologie (Wang *et al.*, 2016). Ainsi, sur la base de plusieurs études à la fois *in vitro* et *in vivo*, Kawahara et Kato-Negishi montrent que l'aluminium pourrait intervenir à de nombreux moments dans la survenue de la maladie (Kawahara et Kato-Negishi, 2011) (Figure 8). À ce jour cependant, aucune étude n'a pu établir une relation de cause à effet solide entre l'exposition à ce contaminant et le développement de la maladie d'Alzheimer, même si cette hypothèse a également été avancée pour la maladie de Parkinson et d'autres pathologies neurologiques. L'étiologie exacte de ces maladies restant encore floue et multiple, il est particulièrement difficile d'établir des liens de causalité avec des facteurs environnementaux, mais cette hypothèse reste toujours en débat et d'actualité.

Très récemment, une équipe de recherche a montré que des cellules épithéliales qui avaient été en contact avec de l'aluminium étaient capables d'induire des tumeurs chez l'animal, alors que les cellules n'ayant pas été exposées n'en induisaient pas (Mandriota *et al.*, 2016). Dans une autre étude parue en 2003, les auteurs montrent une relation entre la survenue plus tardive du cancer du sein chez des femmes n'ayant jamais utilisé d'anti-transpirants à base d'aluminium (67 ans contre 59 ans chez des femmes utilisant des anti-transpirants à base de sels d'aluminium) (McGrath, 2003). Ces deux études, parmi d'autres, semblent incriminer l'aluminium dans le développement du cancer du sein qui serait plus précoce pour les sujets utilisant des déodorants contenant de l'Al. *A contrario*, Allam montre dans son étude qu'aucune association entre aluminium et cancer du sein ne peut être établie (Allam, 2016), voire même qu'il y aurait un effet protecteur de l'Al contre ce type de cancer. L'auteur souligne également que seulement 2 études cas-témoins ont été menées, ce qui est très peu pour tirer de réelles conclusions sur une possible association, positive ou négative. De plus, l'absorption par voie cutanée est très mal connue, et ne permet pas de connaître le réel devenir de l'aluminium déposé sur les aisselles (ANSM, 2011).

Perspectives de recherche En plus de s'accumuler dans le cerveau et les os, lors de l'ingestion d'aliments contaminés, l'un des premiers organes à faire face à ce métal est l'intestin. Une étude a ainsi montré qu'une fois au contact de la muqueuse intestinale, l'aluminium peut induire un stress

oxydant et une inflammation de la muqueuse intestinale, et augmenterait la perméabilité intestinale (Pineton de Chambrun *et al.*, 2014 ; Esquerre *et al.*, 2018). A l'heure actuelle, aucunes autres études sur la toxicité de l'Al au niveau intestinal n'a été publiée.

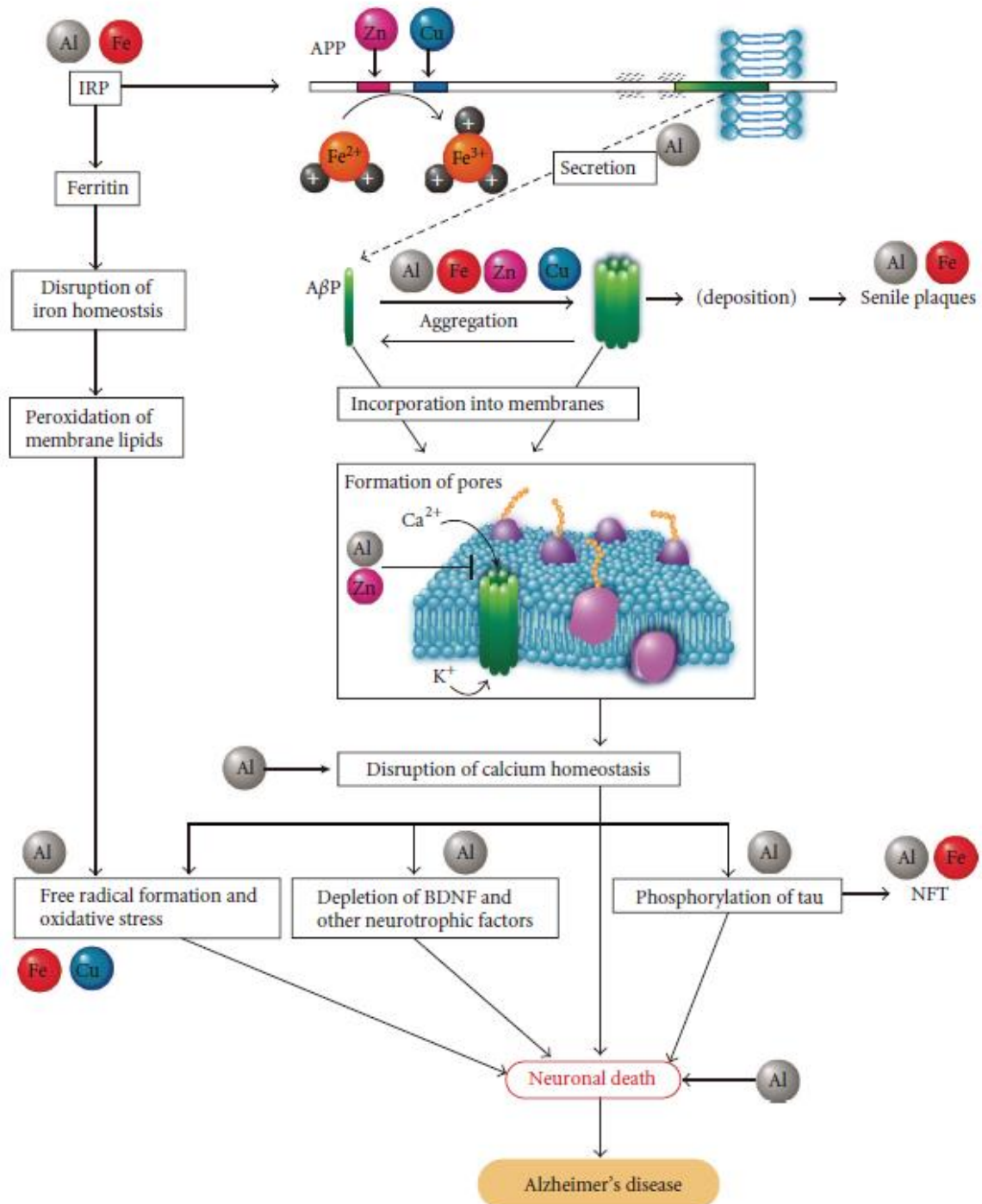


Figure 8 Hypothèses mécanistiques de l'implication de l'aluminium et d'autres ETM (Cu, Fe, Zn) dans le développement de la maladie d'Alzheimer. Kawahara et Kato-Negishi, 2011.

II. Les bactéries lactiques (BL) et autres bactéries du microbiote

1. Le microbiote intestinal

Le système digestif est composé de différentes sections et organes qui se succèdent, ayant chacun des particularités physicochimiques propres. Il commence au niveau de la bouche pour se terminer à l'anus. Parmi les organes qui le composent, on retrouve notamment les intestins, eux-mêmes divisés en sous-parties dont l'une des parties terminales, le côlon, possède la plus forte densité bactérienne (Walter et Ley, 2011) (Figure 9).

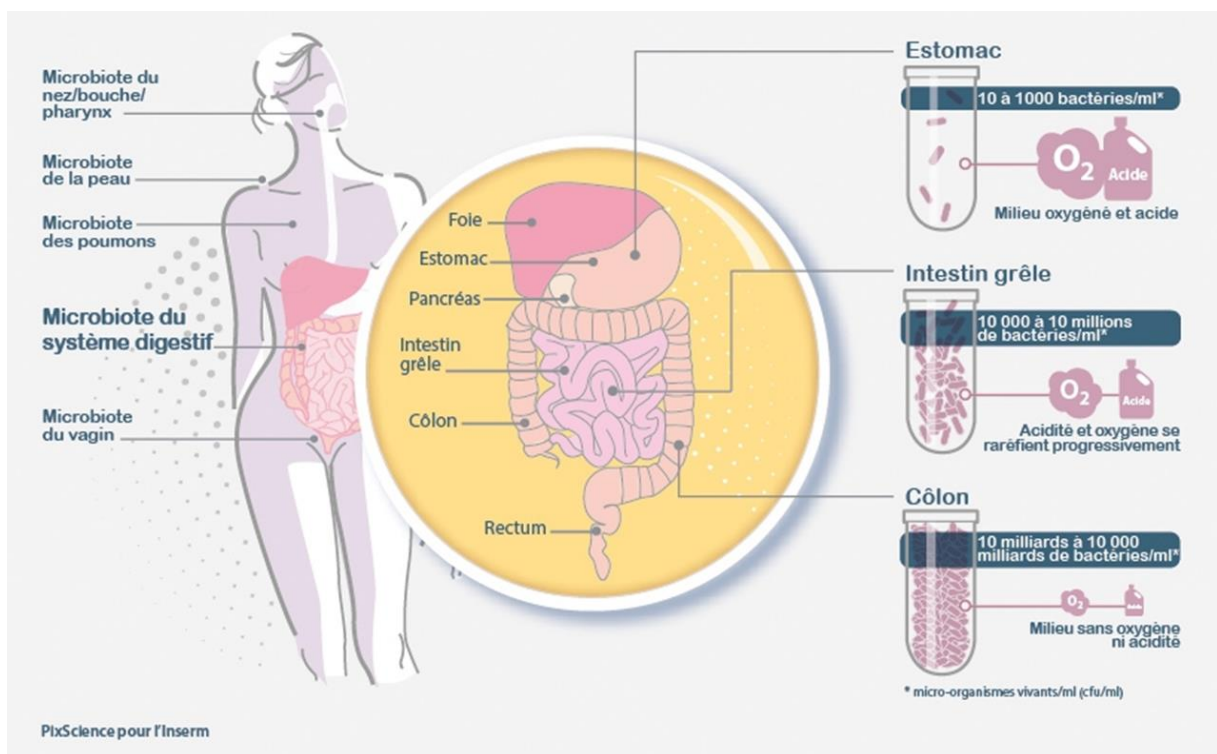


Figure 9 Représentation des différents microbiotes retrouvés dans l'organisme, focus sur le microbiote du système digestif. Pixscience pour l'INSERM (<https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/microbiote-intestinal-flore-intestinale>)

Dans l'intestin, on distingue ainsi le milieu intestinal, ou liquide intestinal, fortement réduit et anaérobie, du mucus intestinal. Ainsi, les genres bactériens les plus représentés et surtout les mieux adaptés aux conditions retrouvées dans le tractus digestif sont anaérobies stricts. Au-delà d'avoir parfois perdu les mécanismes enzymatiques leur permettant de faire la respiration, certaines espèces ont également perdu leurs capacités à synthétiser des composés qu'elles doivent obligatoirement trouver dans leur environnement. Souvent, ces composés sont produits par d'autres espèces bactériennes, ou sont amenées par l'alimentation, ce qui crée un trio hôte-aliments-microbiote. Les

bénéfices sont mutuels, car ce microbiote contribue à la digestion des aliments pour permettre une bonne assimilation par l'hôte des nutriments qu'ils contiennent.

L'étude du microbiote dominant a longtemps été limitée par les conditions de culture des bactéries. Jusque dans les années 1970, la culture en anaérobiose n'était pas connue (Hungate, 1969; Freter, 1974), seulement 30 % des espèces dominantes composant le microbiote étaient cultivables (Finegold *et al.*, 1983). Même à l'heure actuelle, il est difficile d'avoir accès en culture à l'ensemble des espèces qui constituent le microbiote intestinal (Tableau 3). Des recherches de métagénomique récentes permettent de détecter des dizaines de milliers de génomes potentiels (Nielsen *et al.*, 2014 ; Almeida *et al.*, 2019). Les principales limites sont les difficultés à reproduire à l'identique les niches écologiques retrouvées naturellement, et particulièrement les interdépendances, parfois presque absolues, entre certaines espèces. Le microbiote sous-dominant est le mieux connu car essentiellement composé d'espèces anaérobies facultatives, donc plus facilement cultivables. Il s'agit parfois de souches dites transitoires, apportées par l'alimentation ou provenant des parties hautes du tube digestif. Même si lorsque l'on ne considère que les phyla bactériens, la composition du microbiote reste globalement similaire d'un individu à l'autre, chaque hôte possède une signature de microbiome qui lui est propre. En d'autres mots, il existe une certaine stabilité des groupes phylogénétiques, avec des variabilités marquées interindividuelles au niveau des espèces retrouvées chez chaque individu (Zoetendal *et al.*, 1998; Eckburg *et al.*, 2005).

Tableau 3 Genres bactériens majoritaires présents dans le microbiote intestinal. Les bactéries sont classées en fonction du phylum auquel elles appartiennent, et selon leur caractère Gram + ou Gram -

Gram +			Gram -		
Phylums	Firmicutes	Actinobacteria	Bacteroidetes	Proteobacteria	Verrucomicrobia
Espèces majoritaires	<i>Clostridium</i> , <i>Staphylococcus</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Pediococcus</i> <i>Enterococcus</i> <i>Streptococcus</i> <i>Leuconostoc</i> <i>Faecalibacterium</i> <i>Carnobacterium</i> <i>Weissella</i>	<i>Bifidobacterium</i> <i>Propionibacterium</i> <i>Micrococcus</i> <i>Collinsella</i> <i>Eggerthella</i>	<i>Bacteroides</i> <i>Parabacteroides</i> <i>Prevotella</i>	Entérobactérales (<i>Escherichia</i> , <i>Klebsiella</i>) <i>Helicobacter</i>	<i>Akkermansia</i>

Il est bien connu aujourd'hui que le microbiote s'implante à la naissance, mais évolue au cours de la vie. Le fœtus *in utero* étant stérile, le mode d'accouchement est donc déterminant pour la mise en place du microbiote de l'enfant. Même si les facteurs déterminant l'implantation d'une souche plutôt

qu'une autre sont encore inconnus, on sait maintenant que le mode d'accouchement par voie basse permet une colonisation plus rapide de l'intestin par des souches d'origine fécale et vaginale de la mère (Campeotto *et al.*, 2007). Les premières bactéries à s'implanter sont les bactéries aérobies-anaérobies facultatives, de types entérobactéries, entérocoques et staphylocoques : elles utilisent l'oxygène disponible, et rendent l'intestin anaérobie, terrain propice au développement et l'implantation des genres bactériens qui deviendront alors prédominants pour le reste de la vie comme les *Bacteroides*, *Clostridium* et *Bifidobacterium*. Le microbiote représente un équilibre qui peut être influencé par de nombreux facteurs comme le mode d'alimentation, l'antibiothérapie ou encore l'âge (puberté, grossesse, vieillissement...) (Konkel, 2013).

De nos jours, l'utilité du microbiote intestinal est de mieux en mieux comprise (Figure 10). Les diverses bactéries qui le composent jouent un rôle dans la fonctionnalité directe du tube digestif, participant ainsi, par exemple, à la digestion de certains substrats, la synthèse de vitamines ou encore la motricité et la fonction de barrière de l'intestin (Figure 10). Certaines de ces espèces sont connues pour être pathogènes, c'est le cas des *Escherichia coli* responsables de diarrhées notamment. D'autres souches d'*E. coli* sont commensales, et participent activement à la protection contre les pathogènes, par occupation de niche écologique et production de bactériocine par exemple. Outre les bactériocines produites par les *Lactobacillus*, la colicine, découverte en 1925, est produite par *E. coli* (Cascales *et al.*, 2007). Elle permet aux *E. coli* commensales de s'assurer une place dans les niches écologiques de l'intestin. Parmi les *E. coli* bénéfiques, on compte l'*Escherichia coli* Nissle (EcN), isolée en 1917 et aujourd'hui utilisée comme probiotique. Elle possède des activités immunomodulatrices, en maintenant l'homéostasie intestinale (Cross *et al.*, 2004). EcN renforce également la fonction de barrière physique de l'intestin, en augmentant significativement la production des protéines de jonction serrées *zonula occludens* ZO-1 et ZO-2 comparée à la souche d'*E. coli* K12 (Ukena *et al.*, 2007). Elle possède également une capsule K5, retrouvée chez seulement 1 % des *E. coli*, lui permettant d'adhérer aux cellules et de coloniser l'intestin (Herias *et al.*, 2007). Elle est donc ainsi capable d'entrer en compétition avec les pathogènes, mêmes adhérents.

Le microbiote a également un rôle « d'éducation » du système immunitaire. Macpherson et Harris démontrent en 2004 que le système immunitaire de souris axéniques comporte de nombreuses anomalies comparées à celui de souris classiques (Macpherson et Harris, 2004). Ils retrouvent une hypoplasie des Plaques de Peyer, l'absence de certaines populations de lymphocytes T ou encore une baisse de sécrétion des IgA. La réversibilité de ces anomalies par la cohabitation de ces souris axéniques avec une souris SPF (*specific-pathogen-free*) - contenant un microbiote simple - démontre bien l'implication du microbiote intestinal dans l'éducation du système immunitaire.

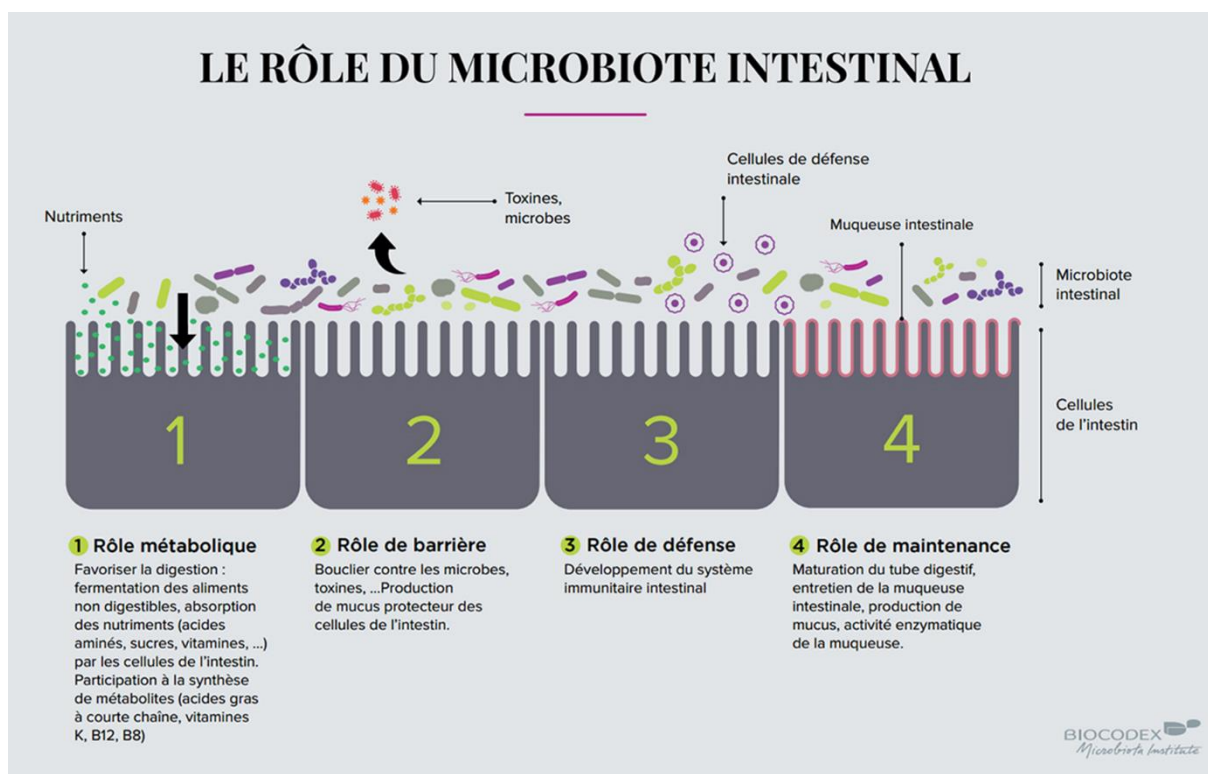


Figure 10 Les différents rôles du microbiote. Site de *Biocodex Microbiota Institute* (<https://www.biocodexmicrobiotainstitute.com/intestinal>).

2. Les Bactéries lactiques (BL)

a. Présentation des BL

Les BL sont des bactéries à Gram positif, caractérisées par la formation d'acide lactique suite à la fermentation des carbohydrates. Elles sont capables de s'adapter à de nombreuses niches écologiques, et donc de modifier leur métabolisme en conséquence. Il existe ainsi de nombreux genres bactériens regroupés dans les BL. En 2013, 192 espèces de LAB étaient répertoriées. Parmi les plus connues, on retrouve les *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, et *Weissella* (Figure 11). Ce groupe de bactéries est bien souvent à tort réduit aux bactéries du genre *Lactobacillus*, dont on compte aujourd'hui plus de 240 espèces identifiées. Elles sont toutes très différentes en termes de morphologie, de conditions optimales de culture, de métabolisme, de tolérance à la fois aux différents pH et à la concentration en sels, mais également en termes de protéines sécrétées et de parois (Lebeer *et al.*, 2010 ; Pessione, 2012 ; Ganzle, 2015).

Les *Lactobacillus* sont couramment utilisées pour la fabrication des aliments fermentés. Ils servent par exemple à la fabrication du pain où la farine de blé et les pâtes à pain sont naturellement riches en lactobacilles. La fermentation secondaire du vin, normalement assurée par une BL *Oenococcus oeni*,

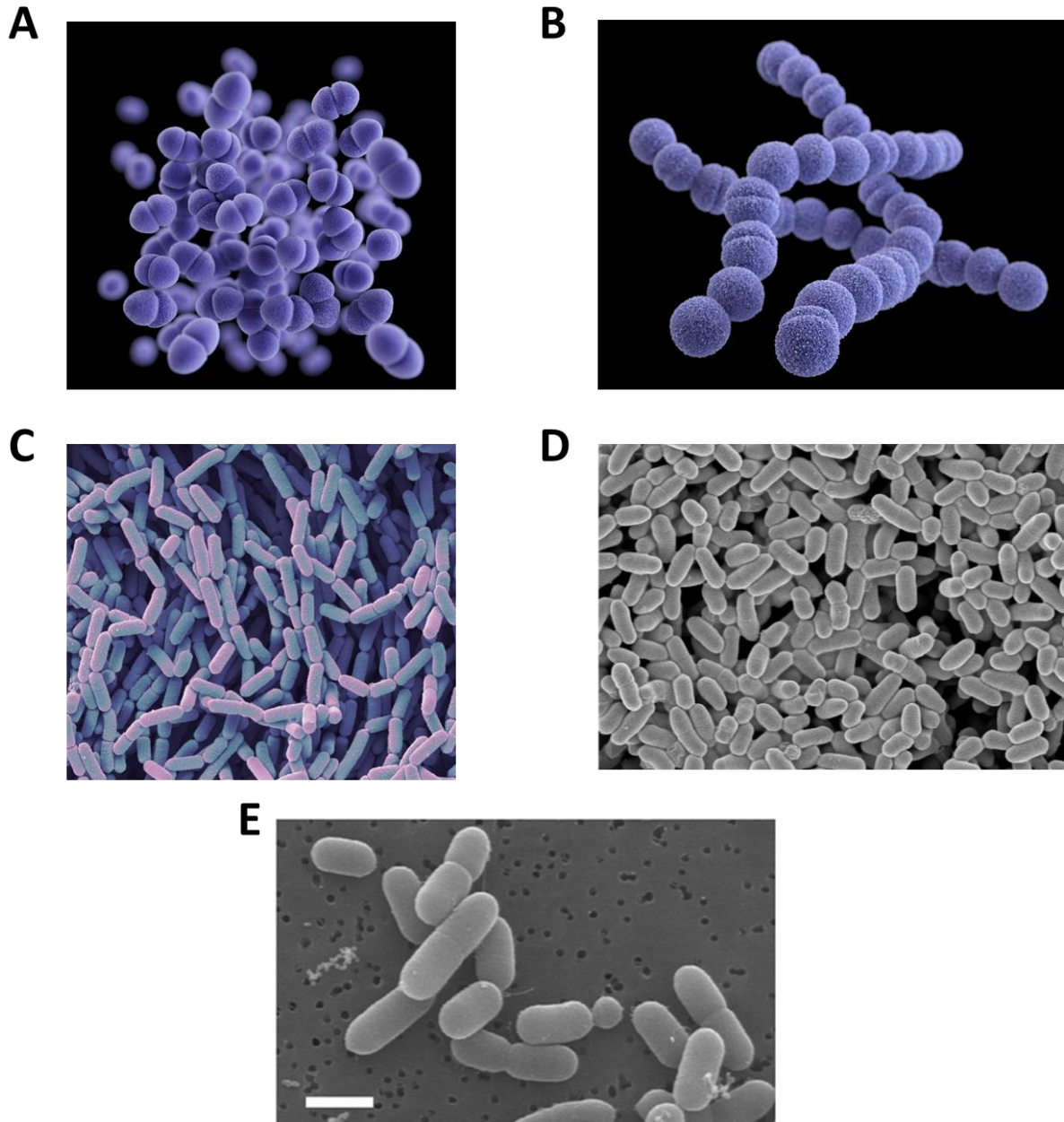


Figure 11 Photographies d'espèces de LAB (A) Colorisation et représentation 3D d'*Enterococcus*, basée sur une image de microscopie électronique à balayage (MEB). Crédit photo : Dan Higgins/ CDC. (B) Colorisation et représentation 3D de *Streptococcus agalactiae*, basée sur une image de MEB. Crédit photo Alissa Eckert/ CDC. (C) Colorisation de *Lactobacillus rhamnosus* basée sur une image de MEB. Crédit photo : Steve Gschmeissner/ FineArtAmerica. (D) Image de MEB de *Weissella confusa*. Jin *et al*, 2019. (E) Image de MEB de *Carnobacterium inhibens*, la barre représente 1 µm (Nicholson *et al.*, 2016).

peut, dans certains cas, être réalisée par *Lactobacillus plantarum*. Les fromages sont également des aliments fermentés très riches en lactobacilles. Les LAB sont utiles aux propriétés organoleptiques du vin, en intervenant à l'étape d'affinage des fromages également, ou pour la fabrication des yaourts grâce à une espèce en particulier, *Lactobacillus delbrueckii* spp *Bulgaricus*. Certains types d'aliments fermentés, comme le kimchi coréen ou la choucroute, requièrent la présence de *Lactobacillus*.

Les bactéries du genre *Enterococcus*, dont on comptabilise une cinquantaine d'espèces à l'heure actuelle, sont retrouvées dans de nombreux environnements. Elles sont présentes à la fois dans le sol et le microbiote intestinal animal et humain, agissant ainsi comme des bactéries commensales ou pathogènes selon l'environnement dans lequel elles se trouvent (Lebreton *et al.*, 2013). Elles sont également retrouvées dans l'environnement hospitalier, où elles représentent un danger de par leur résistance naturelle aux antibiotiques, en particulier de la famille des glycopeptides. *Enterococcus faecalis* est parmi les seules BL à posséder une catalase. A l'exception de *Streptococcus* et *Enterococcus*, très peu de cas d'infections dues aux BL ont été rapportées (Goldstein *et al.*, 2015 ; Kamboj *et al.*, 2015).

b. Omniprésence des BL

Les BL sont retrouvées dans divers écosystèmes, notamment dans l'environnement. Elles sont, par exemple, présentes dans le sol ou l'eau. Yanagida *et al.* (2007) ont identifié ces bactéries dans l'eau de lacs Japonais, avec une variation saisonnée en termes de charge bactérienne. On les retrouve également dans le sol, en particulier au niveau de la rhizosphère d'arbres et champignons, et certaines ont même démontré des capacités antimicrobiennes (Fhoula *et al.*, 2013). Très récemment, le concept de phytomicrobiome a été évoqué. Les BL sont notamment utilisées en agriculture comme fertilisants, agents de contrôle du développement des phytopathogènes (bactéries et champignons essentiellement), régulateurs de stress abiotiques, potentialiseurs de la croissance des plantes... Elles sont également présentes, en plus faible proportion, à la surface des fruits et légumes. Plus rarement, on retrouve des espèces endophytes, agissant comme des micro-organismes symbiotiques de la plante (Filaninno *et al.*, 2018). Ces endophytes, notamment du blé, se retrouvent dans la farine et les produits de boulangerie lors du processus de meulage du grain. Ainsi, la grande diversité de BL retrouvée dans les levains pourrait provenir d'une part des endophytes présents dans la plante utilisée, et d'autre part de l'environnement boulanger à savoir le personnel, les insectes ou encore les animaux nuisibles (Minervini *et al.*, 2015). Après multiplication ou inoculation d'aliments avec des BL, leur concentration peut atteindre jusqu'à 8 ou 9 log par gramme, ce qui permet notamment le contrôle du développement de certains pathogènes dans les aliments comme les *Listeria monocytogenes*.

Leur large utilisation dans l'alimentation et leur présence généralement bénéfique dans le microbiote intestinal leur vaut pour certaines d'être classées GRAS (*Generally Recognized As Safe*). Elles sont naturellement présentes dans l'alimentation, et plus particulièrement dans les produits fermentés en général, de par leur présence dans les matières premières de ces aliments (Lortal *et al.*, 2014 ; McAuliffe, 2018). La concentration en BL dans les produits fermentés varie beaucoup, de 4 à plus de 9 log selon le produit, sa fermentation et son écosystème microbien, ceci plus particulièrement dans les fromages. En entrant dans l'organisme par l'alimentation, elles sont ainsi retrouvées au niveau du tractus digestif. Les BL ne représentent que 6 % du microbiote de l'intestin grêle humain (0,5 % au mieux dans le colon), tandis que chez les rongeurs elles représentent 20 % à 60 % de la flore totale (Heeney *et al.*, 2018). Le cas des lignées de souris de laboratoire est un peu particulier, car leur abondance passe d'indétectable à presque 100 % de la flore totale selon la lignée considérée (Friswell *et al.*, 2010 ; Nguyen *et al.*, 2015), le régime auquel elles sont soumises (Trompette *et al.*, 2014), ou encore les éventuelles modifications du rythme circadien (Voigt *et al.*, 2014). Chez les souris sauvages, le microbiome est composé en moyenne de 30 % de *Lactobacillales*, avec des changements marqués entre les saisons (60 % en été contre 20 % en automne) qui s'expliquent probablement par des changements d'alimentation (Maurice *et al.* 2015).

En 2016, une étude a démontré la présence de 60 espèces de *Lactobacillus* dans les fèces humaines, dont deux majoritairement retrouvées que sont *L. rhamosus* et *L. acidophilus* (Rossi *et al.*, 2016). Il reste pourtant difficile de donner une proportion chiffrée générale car il y a une forte variation inter-individuelle (Booijink *et al.*, 2010). Par exemple, les entérocoques, majoritairement représentés par *E. faecium* et *E. faecalis* dans le microbiote intestinal, sont globalement 10 à 100 fois plus présents que les *Lactobacillus*. En plus des BL « résidentes », on retrouve des bactéries transitoires, incapables de s'implanter chez l'hôte, aussi appelés « pseudocommensales » ou « transientes » (Rook, 2013). Elles sont notamment apportées par l'alimentation ou *via* des compléments alimentaires (probiotiques par exemple). Ainsi, leur concentration dans le tube digestif varie fortement en fonction du régime alimentaire et des zones géographiques (Plé *et al.*, 2015). Pour autant, si ces bactéries sont ingérées régulièrement et en assez grande quantité, elles peuvent avoir un effet sur la santé, bénéfique comme délétère.

Le mode d'accouchement influence beaucoup l'abondance des BL chez les enfants de moins de 2 ans, avec une faible abondance associée à la césarienne et au contraire une forte densité associée à l'accouchement par voie basse. Cette différence marquée s'atténue après 2 ans de vie (Dominguez-Bello *et al.*, 2010). Alors que ces bactéries sont normalement prédominantes au moment de la colonisation de l'intestin par le microbiote à la naissance, elles deviennent petit à petit subdominantes à l'enfance, et plus tard à l'âge adulte. La contamination de l'enfant par des BL au moment de

l'accouchement par voie basse s'explique par le fait que les *Lactobacillus* représentent la flore vaginale majoritaire chez une femme en bonne santé, atteignant les 70 à 90% des bactéries résidentes. On note que la colonisation vaginale par les BL chez d'autres mammifères, primates y compris, est très faible (de l'ordre de 1 %) (Miller *et al.*, 2016). Même si la flore est en général dominée par la présence de lactobacilles, la présence d'autres genres comme des pédiocoques ou des *Weissella*, *Streptococcus* ou encore *Leuconostoc* a été rapportée. Ces concentrations sont, à nouveau, comme pour le microbiote intestinal, très variables d'une femme à l'autre. L'appartenance ethnique et le moment du cycle (enceinte ou ménopausée par exemple) sont également des critères qui influencent fortement le microbiote vaginal (Borges *et al.*, 2014). Une déficience en *Lactobacillus* dans le microbiote vaginal n'est pas forcément péjorative pour la bonne santé de la femme, mais ces espèces permettent de lutter contre les éventuels pathogènes par le biais de leurs propriétés anti-infectieuses. Les *Lactobacillus*, à l'issue de l'utilisation du glycogène, produisent du lactate qui permet le maintien d'un pH acide au niveau vaginal. La majorité d'entre elles (95 % environ) produisent également du peroxyde d'hydrogène, proportion qui diminue à 6-20 % dans le cas d'une vaginose (Vanechoutte, 2017a). Les propriétés anti-inflammatoires des *Lactobacillus* en général pourraient également permettre de réduire l'infektivité du VIH (Gosmann *et al.*, 2017).

Les BL peuvent aussi être retrouvées au niveau du microbiote pulmonaire. Les études sur les communautés microbiennes des poumons sont très récentes, et peu de données sont encore disponibles sur ce sujet, mais plusieurs observations montrent que la présence des BL influencerait l'écosystème microbien des poumons. Dans le cas de l'asthme, la présence d'*Enterococcus faecalis* est corrélée à une plus forte sévérité de la maladie chez l'Homme, et son absence améliore les symptômes de l'asthme chez le modèle souris (Remot *et al.*, 2010). Au contraire, l'administration nasale de *Lactobacillus rhamnosus* GG modifie le microbiote du poumon et confère une protection contre le virus de la grippe (Harata *et al.*, 2010). Ces connaissances ouvrent de nouveaux champs thérapeutiques potentiels pour lutter contre les infections et/ou les maladies respiratoires.

c. Propriétés intéressantes des BL

Propriétés anti-inflammatoires Les BL possèdent des propriétés anti-inflammatoires qui ont été très étudiées, principalement chez le rongeur (Hevia *et al.*, 2015 ; Papadimitriou *et al.*, 2015). Des études montrent un réel bénéfice à l'apport exogène de BL, que ce soit par l'alimentation ou par l'apport de compléments alimentaires comme des probiotiques par exemple. En parallèle, une baisse du taux de lactobacilles chez les patients atteints de maladies infectieuses chroniques de l'intestin (MICI) a été démontré. Au-delà de la quantité brute de BL présentes, il est important de regarder les espèces

présentes/absentes avant de conclure à un quelconque bénéfice ou effet délétère, car des études montrent que leur taux peut à la fois varier à la hausse ou à la baisse selon la pathologie considérée (Forbes *et al.*, 2016 ; Heeney *et al.*, 2018). Les mécanismes mis en jeu, et surtout les protéines retrouvées chez certaines bactéries, leur permettent parfois d'améliorer les symptômes de la maladie. Notamment, dans le cas des colites, l'amélioration de la clinique a été attribuée à la présence d'un exopolysaccharide en particulier chez *L. plantarum* (Gorska *et al.*, 2014), un pili pour *L. rhamnosus* (Lebeer *et al.*, 2012), ou encore une protéine S-layer pour *L. acidophilus* (Konstantinov *et al.*, 2008). L'effet de *L. salivarius* est, cette fois, dépendant de son peptidoglycane (Macho Fernandez *et al.*, 2011). La production d'H₂O₂ par *L. crispatus* et *L. rhamnosus* permet une baisse de l'inflammation également (Voltan *et al.*, 2008 ; Lin *et al.*, 2009). Les *Lactobacillus* ne sont pas les seules BL à présenter des effets bénéfiques vis-à-vis de l'inflammation. Des pédiocoques et oenocoques (Foligné *et al.*, 2010), carnobactéries (Rahman *et al.*, 2014), et entérocoques (Wang *et al.*, 2014) ont pu montrer des propriétés anti-inflammatoires. Même si les effets ne sont pas majeurs en termes d'amélioration de l'inflammation et de la santé humaine en générale, de nombreuses espèces d'entérocoques sont commercialisées en tant que probiotiques. Ils sont utilisés à la fois en santé humaine et animale, et peuvent être combinés à d'autres espèces de BL et/ou des bifides. L'effet anti-inflammatoire de certaines BL ne peut malheureusement pas être généralisé. Dans ce potentiel effet, il faut également prendre en compte le microbiote de l'hôte : cet effet pourra être accentué comme atténué selon le microenvironnement du système digestif, propre à chaque individu.

Propriétés métaboliques En plus de ces propriétés anti-inflammatoires, les BL possèdent des propriétés métaboliques intéressantes pour l'hôte. Cette flore microbienne intestinale joue en effet de nombreux rôles métaboliques chez l'hôte, que ce soit chez la drosophile (Leulier et Royet, 2009), chez les poissons (Egerton *et al.*, 2018), ou encore chez les rongeurs et chez l'homme (Ley *et al.*, 2006 ; Gérard, 2016). Les métabolites produits peuvent avoir un impact sur la faim et la satiété, en modulant les médiateurs intestinaux comme le GLP1, la leptine ou la ghréline. Ainsi, une modification du microbiote intestinal peut conduire à une obésité chronique ou des désordres métaboliques (diabète de type 2, syndrome métabolique par exemple) (Carding *et al.*, 2015). L'utilisation de souris gnotobiotiques, qui sont des souris axéniques chez qui on implante une souche bactérienne donnée, a permis de montrer que le pouvoir glycolytique de *Streptococcus thermophilus* était augmenté chez la souris (Rul *et al.*, 2011). Ces souris axéniques ont également permis de montrer que lorsqu'on leur implante un microbiote de souris obèse, leur poids total est fortement augmenté par rapport à des souris axéniques ayant reçu le microbiote d'une souris « mince » (Turnbaugh *et al.*, 2006). En parallèle, il a été montré que des souris ou des humains obèses recevant respectivement des microbiotes de souris et d'humains minces amélioraient leurs symptômes dans le cadre du syndrome métabolique

(Vrieze *et al.*, 2012 ; Kulecka *et al.*, 2016 ; Ji *et al.*, 2018). Certaines *Lactobacillus* sont également associées au gain de poids, ou au contraire à la protection contre l'obésité (Drissi *et al.*, 2014). Des études du microbiote de patients obèses ou anorexiques ont montré que la quantité de *Lactobacillus* était, respectivement, plus haute ou plus faible comparée à des témoins ayant un IMC normal (Ley *et al.*, 2007 ; Armougom *et al.*, 2009). Au contraire, des proportions plus élevées de lactobacilles ont été associées au diabète de type 2 (Larsen *et al.*, 2010 ; Karlsson *et al.*, 2013). La cachexie, à savoir la perte de la masse musculaire et adipeuse fréquente dans de nombreuses maladies comme certains cancers, peut être améliorée par *L. reuteri* (Bindels *et al.*, 2016). Drissi *et al.* (2014) ont montré, par des approches de génomique comparative, que les espèces de *Lactobacillus* associées à la perte de poids possèdent des gènes d'activité antimicrobienne, notamment des bactériocines, contrairement aux espèces associées à l'obésité, qui possèdent des enzymes liées au métabolisme des lipides. Chez des souris nourries avec un régime *high fat diet* (HFD), l'ingestion de BL diminue le gain de poids, et améliore le profil métabolique (glycémie sanguine, taux d'insuline et de leptine), mais aussi le stress oxydatif et l'inflammation hépatique (Alard *et al.*, 2016 ; Park *et al.*, 2017). Ces études montrent un intérêt récent pour de nouveaux traitements destinés à lutter contre l'obésité et les désordres métaboliques par le biais des probiotiques. Cet effet bénéfique est retrouvé chez des modèles de souris et de rats présentant un diabète induit par la streptozotocine (souris nourries avec un *High Fat Diet*) (Tabuchi *et al.*, 2013 ; Pei *et al.*, 2014), ainsi que chez des rats nourris avec un régime riche en fructose (Hsieh *et al.*, 2013). Ces expériences ont principalement été réalisées avec les souches de *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. gasseri*, *L. casei*, *L. mali*, *L. fermentum* et *L. reuteri* seules ou en combinaison. Même si de nombreuses souches connues comme probiotiques donnent de bons résultats en termes d'amélioration/protection vis-à-vis de l'obésité, aucune conclusion ne peut en être tirée pour les autres souches. Par exemple, *L. salivarius*, connue pour ses propriétés anti-inflammatoires chez la souris, et commercialisée en tant que probiotique, ne permet pas d'éviter l'obésité due au régime riche, ni l'apparition d'une insulino-résistance, contrairement à *L. rhamnosus* (Alard *et al.*, 2016). Des essais cliniques viennent appuyer ces observations. Des souches de *L. acidophilus* et *B. bifidum* réduisent le taux de cholestérol et la glycémie chez des patients âgés après consommation de ces souches une fois par jour pendant un mois (Moroti *et al.*, 2012). Chez des patients diabétiques, après une consommation journalière d'un aliment probiotique contenant *L. acidophilus* et *B. lactis* pendant 6 semaines, une réduction du stress oxydatif ainsi que de la glycémie a pu être observée (Ejtahed *et al.*, 2012). L'une des hypothèses expliquant cette protection contre l'obésité serait que les probiotiques, plus particulièrement les BL, diminueraient l'absorption et la conversion des aliments en énergie, et donc le stockage en graisse, réduisant par là même l'obésité, l'inflammation et les cas de diabète chez les souris et les humains (Kerry *et al.*, 2018). A l'heure actuelle, aucun mécanisme n'a pu être démontré, mais ces constatations ouvrent un large champ des

possibles quant à de nouveaux traitements probiotiques potentiels pour lutter contre l'obésité, et plus largement contre les désordres métaboliques.

Propriétés antimicrobiennes Les BL possèdent également des propriétés antimicrobiennes. Elles sont capables de produire, en plus de l'acide lactique et de l' H_2O_2 (qui possèdent une activité antibactérienne, antifongique et antivirale), des bactériocines. Les bactériocines sont des protéines ou peptides spécifiquement synthétisées par certaines bactéries, et qui possèdent des activités bactériostatiques ou bactéricides (Leroy et De Vuyst, 2004 ; Cotter *et al.*, 2005). Ces molécules jouent un rôle particulièrement important dans la compétition trophique, puisque la bactérie productrice est protégée contre ses propres bactériocines. Il existe, à l'heure actuelle, 3 grandes classes de bactériocines (Alvarez-Sieiro *et al.*, 2016) :

- Classe I : RiPPS (*Ribosomally synthesised and Post-translationally modified Peptides*) qui sont des bactériocines de moins de 10 kDa, modifiées de façon post-traductionnelle
- Classe II : bactériocines de moins de 10 kDa, non-modifiées
- Classe III : bactériocines de plus de 10 kDa

Les bactériocines ont 3 applications majeures : elles sont utilisées comme conservateurs naturels, agents de sélection des probiotiques et antibiotiques. La plupart des bactériocines ne sont pas utilisées directement dans l'alimentation, même si deux d'entre elles (nisine et pédiocine) sont autorisées comme conservateurs alimentaires. Souvent, ce sont directement des souches bactériennes produisant ces molécules qui sont utilisées, et ceci principalement dans les plats préparés, afin de lutter contre la présence de *Listeria monocytogenes* (Alvarez-Sieiro *et al.*, 2016). Au-delà de leur utilisation dans l'alimentation et les préparations alimentaires prêtes à l'emploi, les BL productrices de bactériocines représentent des probiotiques intéressants chez l'homme et l'animal. Une preuve de concept a été établie chez la souris, en utilisant la souche de *L. salivarius* UCC118, productrice de bactériocine, afin de protéger les animaux contre une infection à *L. monocytogenes* (Corr *et al.*, 2007). Une stratégie novatrice pour réduire l'apparition de résistance ou pour potentialiser les effets des antimicrobiens serait de combiner les bactériocines à d'autres antimicrobiens (Mathur *et al.*, 2017).

Autres propriétés Les BL pourraient non seulement être utilisées pour traiter des maladies du système digestif, mais également pour bien d'autres pathologies que se déclarent à plus long terme, comme certains cancers, atteintes neurologiques ou psychologiques. Certaines souches de lactobacilles peuvent ainsi être utilisées pour améliorer les symptômes de l'hyperalgésie viscérale ou de douleur abdominale, en ciblant spécifiquement les signaux nociceptifs. Ces souches ont également été proposées pour le traitement du syndrome de l'intestin irritable (Ringel-Kulka *et al.*, 2014 ; Perez-Burgos *et al.*, 2015). Dans le cas des cancers, certaines études montrent une corrélation inverse entre

la concentration fécale en entérocoques et le développement d'adénomes sur le colon (Kawano *et al.*, 2018), alors que d'autres suggèrent un rôle délétère d'*E. faecalis* dans le développement du cancer colorectal (Huycke *et al.*, 2002). *E. hirae* est, au contraire, utilisé comme *booster* de chimiothérapie (Daillère *et al.*, 2016).

L'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle a été utilisée pour visualiser et mesurer l'activation de l'activité cérébrale induite par les BL (Bagga *et al.*, 2018). Les BL ont également été utilisées comme probiotiques dans les cas de fatigue chronique, dépression ou anxiété (Slykerman *et al.*, 2017). Toutes ces études récentes amènent de nouvelles perspectives d'utilisations de ces bactéries, mais surtout de nouveaux questionnements quant à leurs potentielles interactions avec le cerveau et le système nerveux central.

Les BL sont donc des micro-organismes multifacettes, qui existent sur Terre depuis des millions d'années et qui partagent la vie des animaux et des humains depuis des dizaines de centaines d'années. Elles sont utilisées pour la fabrication de produits fermentés depuis des décennies, et développées comme probiotiques depuis des années (Figure 12).

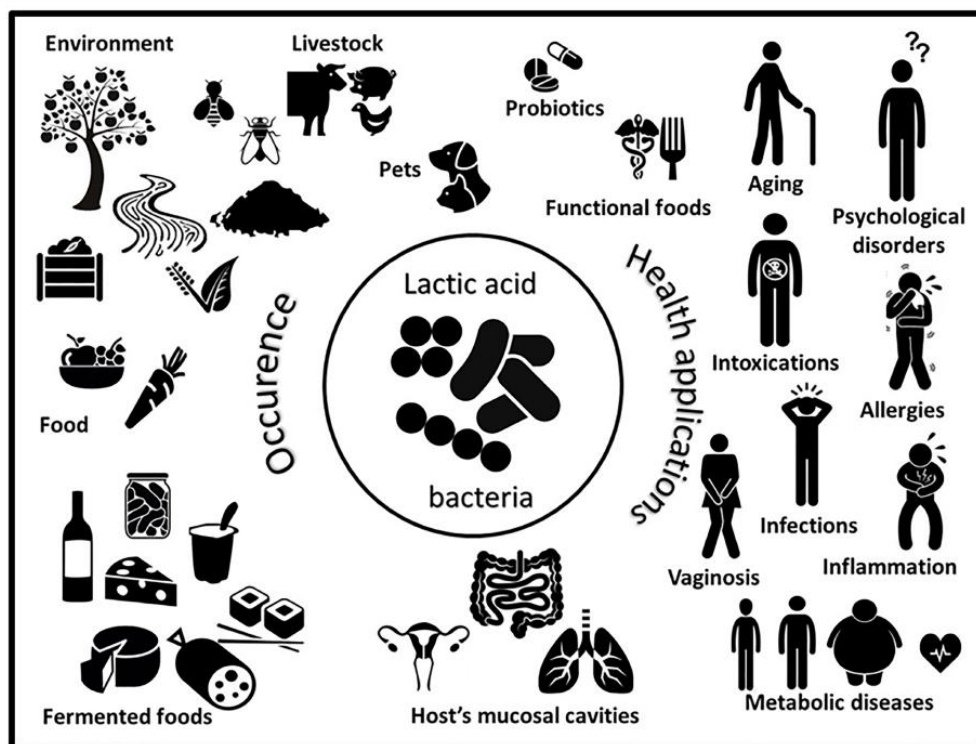


Figure 12 Représentation schématique de l'occurrence et des applications en santé des bactéries lactiques. George *et al.*, 2018.

3. Les Propionibactéries

Les Propionibactéries sont des bacilles Gram +, de formes pléiotropes, non sporulantes, et non motiles (Figure 13). Elles sont caractérisées par la production d'acide propionique, et une structure chromosomique riche en GC. Elles sont généralement anaérobies facultatives, ou aérotolérantes. Le genre *Propionibacterium* était autrefois composé de bactéries saprophytes d'origine laitière, comme *P. freudenreichii*, et de bactéries commensales isolées de la peau. Ces dernières ont été reclassées dans le genre *Cutibacterium* ; on y retrouvait notamment *P. acnes* renommée et reclassée en 2016 comme *Cutibacterium acnes* (Scholz et Killian, 2016).

Sous le genre *Propionibacterium*, on ne retrouve aujourd'hui que les bactéries d'origine laitière. Elles sont utilisées dans l'affinage des fromages à pâte cuite comme le gruyère, l'emmental ou le comté (Dherbecourt *et al.*, 2010 ; Langsrud *et al.*, 1973). Lors de la fermentation, elles produisent de l'acétate, du propionate et du CO₂, gaz à l'origine des trous dans les fromages. L'acétate et le propionate sont, quant à eux, à l'origine de saveurs de noisette. La quantité de *P. freudenreichii* dans un emmental peut atteindre 10⁹ bactéries par gramme. Pour autant, même si elles sont retrouvées en forte quantité dans les fèces lors de la consommation d'aliments contenant ces bactéries, leur concentration redevient normale quelques semaines après l'arrêt de cette consommation. Elles sont donc bien transitoires : elles ne sont pas capables de s'implanter dans le microbiote de l'hôte. De plus, elles possèdent très peu de résistances aux antibiotiques, et pas de facteurs de virulence connus pour la plupart des espèces (Meile *et al.*, 2008). Ainsi, grâce à plusieurs de ces caractères, l'espèce *P. freudenreichii* a reçu en 2002 le statut de « *Generally Recognised As Safe* » ou GRAS (Mogensen *et al.*, 2002). Outre leur utilisation comme « starter » de fromage, les *Propionibacterium* possèdent des activités probiotiques désormais bien documentées de mécanismes variés (Rabah *et al.*, 2016). Sur le plan intestinal, elles peuvent avoir un effet direct sur la composition du microbiote, en favorisant le développement des bifidobactéries (Bouglé *et al.*, 1999). Elles produisent en effet des composés dits bifidogènes, le DHNA et le ACNQ (Isawa *et al.*, 2002 ; Kaneko, 1999), mais aussi le propionate qui est maintenant utilisé dans les milieux sélectifs des bifidobactéries (Kaneko *et al.*, 1994 ; Hartemink and Rombouts, 1999). Le DHNA, outre ses activités bifidogènes, a montré un effet positif sur les scores histologiques et la survie de souris chez qui les auteurs avaient induit une colite au DSS (Okada *et al.*, 2006), en modulant le microbiote et en supprimant l'infiltration lymphocytaire. Ces bactéries sont également capables d'induire la production d'IL-10 dans des cellules mononucléées sanguines humaines (PBMC), permettant de réguler l'inflammation au niveau intestinal (Kekkonen *et al.*, 2008). L'induction de certaines interleukines anti-inflammatoires a été clairement reliée à une protéine de surface SlpB présente chez *P. freudenreichii* CIRM-BIA 129 (Deutsch *et al.*, 2017). Tout comme les *E. coli* et les BL, les *Propionibacterium* produisent des bactériocines (Holo *et al.*, 2002) leur permettant d'entrer en

compétition avec certains pathogènes. Cette compétition passe également par l'adhésion aux cellules intestinales. La capacité de *P. freudenreichii* à inhiber la fixation de *Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium* et *S. heidelberg* a ainsi été démontrée par Nair *et al.* (2017) et est plus largement attribuée aux BL. En effet, *L. rhamnosus*, *L. lactis* et *P. freudenreichii* sont capables de réduire l'adhésion d'un pathogène *Staphylococcus aureus* de 44 %, 41 % et 39 %, respectivement (Vesterlund *et al.*, 2006). Dans certaines conditions, *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* JS diminue également la viabilité de *S. aureus*. Elles sont également en capacité de s'agréger avec les pathogènes (Collado *et al.*, 2007).

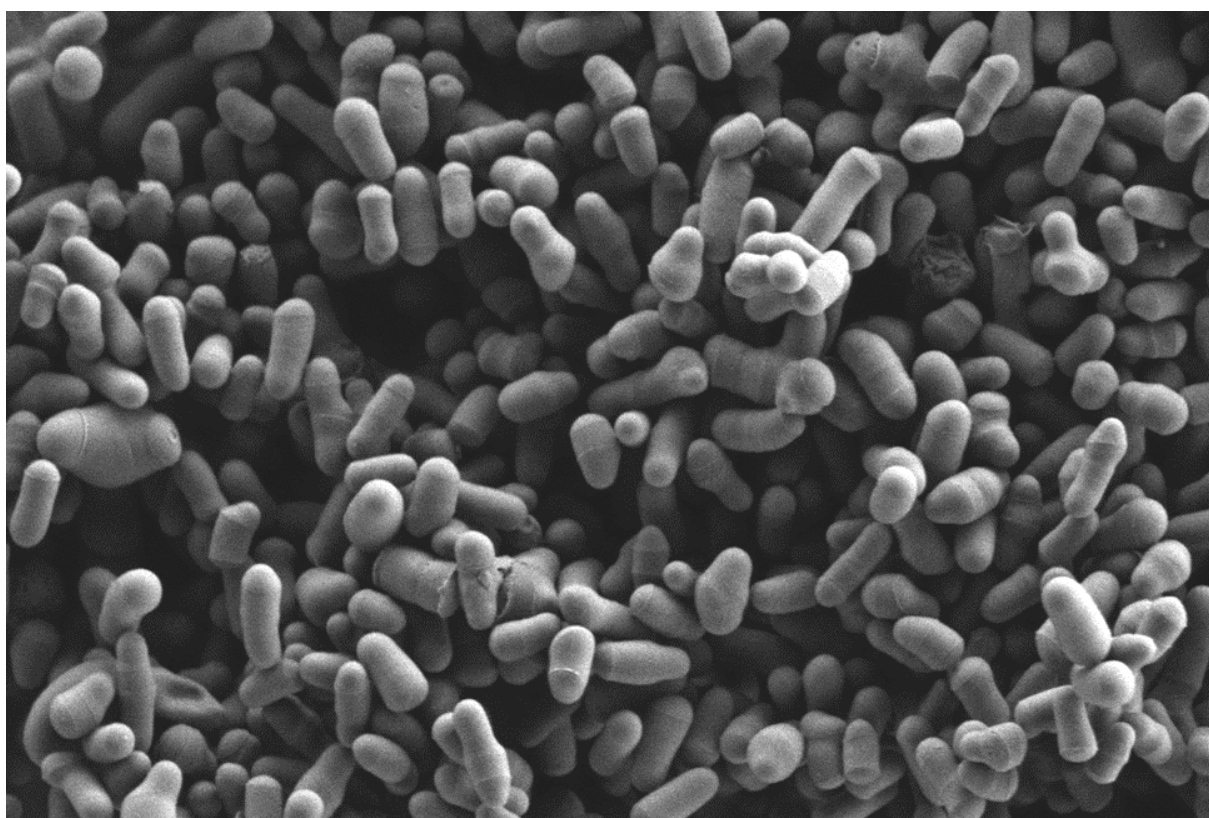


Figure 13 Image de MEB de *Propionibacterium freudeinreichii*. Crédit photo : Nicolas Barrois, Plateforme BiCell, Institut Pasteur Lille. Grossissement x 8 000.

P. freudenreichii est capable d'induire l'apoptose dans des cellules endommagées par un carcinogène, le DMH (1,2-diméthylhydrazine) (Lan *et al.*, 2008). Par la production d'acides gras à chaîne courte, certaines Propionibactéries sont capables de tuer des cellules cancéreuses HeLa, HT29 et Caco2 en perméabilisant les membranes des mitochondries (Jan *et al.*, 2002). Les propionibactéries sont également impliquées dans la réduction des risques de cancer en liant des composés carcinogènes, telles que l'aflatoxine B1 ou encore les métaux lourds comme le plomb et le cadmium (Haltunnen *et*

al., 2008a). L'ensemble des propriétés des propionibactéries et leur innocuité justifient pleinement leur utilisation comme probiotique, dont certaines souches sont commercialisées depuis plusieurs années.

III. La dépollution des ETM

Les méthodes utilisées pour dépolluer les ETM seront différentes en fonction de plusieurs critères, comme le prix, le polluant et la nature de ce qu'il faut décontaminer. Certaines méthodes sont basées sur des principes physiques (excavation, lessivage, traitement électrocinétique etc...), alors que la bioremédiation met en jeu des organismes vivants pour dégrader les polluants.

1. L'assainissement des sols et matières inorganiques

Une des premières stratégies utilisées pour lutter contre la pollution des sols est l'**excavation** des sols pollués, qui consiste à récupérer la partie du sol contaminée, et de la déplacer pour la décontaminer. Cette technique permet principalement d'éviter la contamination des sols environnants et éventuellement des nappes phréatiques situées à proximité. Un **traitement thermique** peut être utilisé, en chauffant les sols à 400-600°C afin de volatiliser les métaux. Les gaz passent alors à travers un filtre afin de récupérer les métaux d'un côté, et les sols décontaminés de l'autre (Haemers et Simonnot, 2018). Ces sols sont ensuite assez facilement valorisables sous la forme de terre de remblayage. Cette technique, bien que très coûteuse, est efficace car elle permet de traiter des sols fortement pollués en faisant chuter la plupart des concentrations en ETM à moins de 100 ppb.

Une autre technique est l'extraction des ETM par **méthode électrocinétique**. Il s'agit alors d'insérer des électrodes (anodes et cathodes) dans les sols contaminés, et d'y appliquer un courant afin de mobiliser les contaminants chargés (Pazos *et al.*, 2010). Ces contaminants se dirigent alors vers l'électrode de charge opposée, et s'y concentrent. Cette terre alors fortement chargée en métaux pourra ensuite être excavée pour être traitée par d'autres méthodes. L'avantage de ce procédé est de réduire la quantité de terre à traiter par des méthodes ultérieures.

Le traitement par **lavage**, ou **lessivage**, est une technique supplémentaire visant à réduire la quantité de polluants dans un sol donné. Il s'agit alors d'extraire ces contaminants en inondant le sol et en récupérant et traitant l'eau de lavage (Lallemand-Barres *et al.*, 1993) (Figure 14). L'agent de lessivage peut soit être de l'eau, soit un agent chimique. L'avantage de cette technique est qu'elle peut être

appliquée directement sur les sols, sans avoir besoin d'excaver la terre. Le gros inconvénient est que souvent, les agents utilisés sont acides : l'acidification de la terre peut en altérer les propriétés.

D'autres procédés utilisant des barrières étanches ou non (méthode de confinement ou d'immobilisation physique), placées aux extrémités des sites contaminés, peuvent également être utilisés.

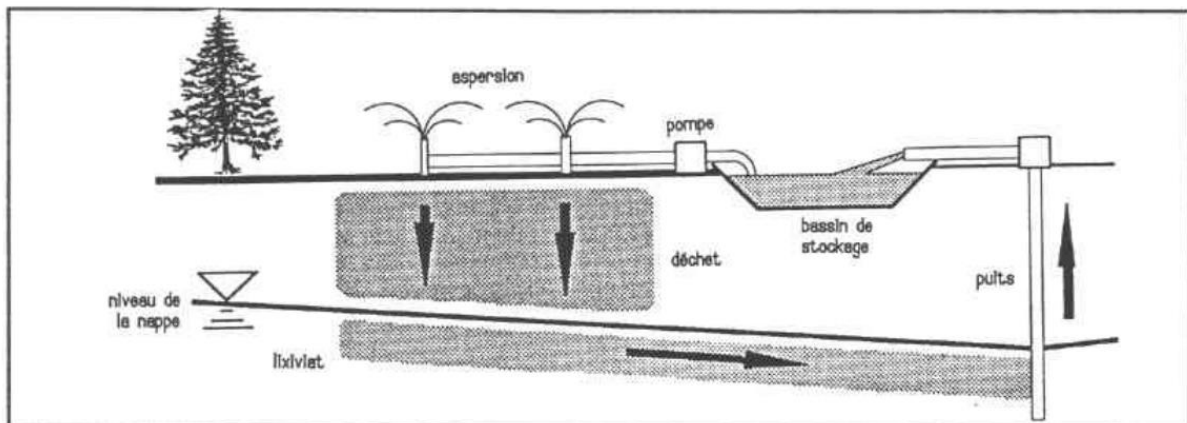


Figure 14 Schéma d'un système de lessivage. L'eau entraîne les polluants et est ensuite recyclée/traitée (Lallemant-Barres *et al.*, 1993).

2. La bioremédiation

La phytoremédiation est également une technique utilisable pour la décontamination des sols, des eaux ou même de l'air ambiant. L'avantage de cette technique, entre autre, est qu'elle ne nécessite aucune excavation de la terre. La phytoremédiation englobe l'utilisation de plantes, d'algues (qualifiée de phycoremédiation) ou de champignons (mycoremédiation). Pour les plantes, il s'agit de les cultiver directement sur les sites pollués, en utilisant leur capacité à fixer ou dégrader les polluants selon leur nature. Selon le polluant concerné, la plante peut utiliser différents mécanismes : la phytoextraction, la phytostabilisation, la phytotransformation/phytodégradation, la rhizofiltration, ou la phytovolatilisation. Certaines plantes sont qualifiées d'hyper-accumulatrices car elles accumulent de fortes quantités de polluants, dont les métaux. Ainsi, *Crotalaria juncea* (chanvre) et *Avena strigosa* (avoine) ont montré des capacités de fixation de fortes concentrations en cadmium ($> 100 \text{ mg Cd/kg}$ poids sec) (Uraguchi *et al.*, 2006). Les HAP, contaminants également très préoccupants des sols, peuvent aussi être dégradés par les micro-organismes de la rhizosphère des plantes (Alkorta et Garbisu, 2001). Le principal désavantage de cette technique est la durée de traitement, et généralement la nécessité d'incinérer les plantes à la suite du procédé.

Les algues sont très connues pour leur résistance aux polluants, et aux métaux notamment (Chekroun et Baghour, 2013). L'utilisation des plantes et des algues sont des techniques complémentaires, car la première permet de traiter les sols, alors que la seconde permet de traiter l'eau. De nombreuses espèces ont été identifiées pour accumuler les métaux, parfois même plusieurs métaux pour une seule et même espèce (Chekroun et Baghour, 2013). L'avantage supérieur des algues par rapport aux plantes est leur petite taille, qui leur permet de représenter un *ratio* de surface/volume considérable et la facilité de les manipuler génétiquement. En effet, certaines enzymes sont connues pour être responsables de l'accumulation de ces métaux, et la facilité de créer des OGM qui expriment voir surexpriment ces enzymes est un atout majeur. C'est notamment le cas des métallothionéines et phytochélatines.

3. Utilisation des bactéries pour la bioremédiation *in vivo*

La bioremédiation *in vivo* concerne de nombreuses molécules nocives ou polluantes, comme les pesticides, toxines ou encore les ETM. La bioremédiation est utilisée depuis des années pour la dépollution de l'environnement car c'est l'une des techniques les moins coûteuses, les plus simples d'application et surtout la plus respectueuse de l'environnement. En revanche, l'application de cette technique au vivant (*in vivo*) n'en est qu'à ses prémices.

a. La bioremédiation des xénobiotiques

Des espèces de *Lactobacillus* et de *Leuconostoc*, isolées du kimchi, un plat fermenté traditionnel coréen, possèdent des gènes codant des hydrolases d'organophosphores, et sont capables de dégrader des insecticides tels que le chlorpyrifos-éthyl et le parathion éthyl (Islam *et al.*, 2010). Ainsi, les *Lactobacillus* présentes dans le microbiote des insectes ont été associées à la résistance aux pesticides de chlorpyrifos-éthyl et au fipronil (Xia *et al.*, 2013). D'autres études, plus récentes, menées chez la drosophile, montrent que l'utilisation de *L. rhamnosus* réduit l'absorption et donc la toxicité des pesticides organophosphorés et néocotinoïdes (Trinder *et al.*, 2016 ; Daisley *et al.*, 2018). Ces études sont encourageantes au regard du problème de surmortalité des abeilles en lien avec l'utilisation de ces pesticides. En effet, l'utilisation de probiotiques dans la nourriture des abeilles pourrait constituer une piste de lutte contre ce problème environnemental particulièrement préoccupant.

Les BL peuvent également moduler la toxicité de certaines mycotoxines comme les aflatoxines (B1, F1 et M1), la patuline, l'ochratoxine A ou encore le déoxinivalénol dans l'alimentation en les chélatant

(Fuchs *et al.*, 2008 ; Ahlberg *et al.*, 2015). Certains Pédicoques possèdent des capacités de dégradation et d'absorption des mycotoxines (Martinez *et al.*, 2017). Les *Propionibacterium* possèdent des capacités de fixation de divers composés comme l'aflatoxine B1 qui est un contaminant très fréquent de l'alimentation (El-Nezami *et al.*, 1998), et qui a des propriétés tératogènes, génotoxiques et cancérogènes. Les BL ont déjà été utilisées dans des études chez le rat (Hernandez-Mendoza *et al.*, 2011 ; Nikbakht Nasrabadi *et al.*, 2013) et la souris (Jebali *et al.*, 2015) pour diminuer la biodisponibilité des aflatoxines. Une étude pilote, réalisée par El-Nezami *et al.* en 2000 montre des résultats encourageants, puisqu'une réduction de la concentration fécale en aflatoxine B1 chez des volontaires ayant reçu un mélange de *Lactobacillus* et *Propionibacterium* a été mise en évidence. Il a également pu être démontré que certaines BL, par le biais de leurs acides téichoïques, sont capables de fixer l'acrylamide, à la fois *in vitro* (Serrano-Nino *et al.*, 2014) et dans un modèle de digestion, consistant à recréer un système digestif artificiel à l'aide de réacteurs mimant les différents compartiments intestinaux (Rivas-Jimenez *et al.*, 2016). Ces composés étant toxiques et carcinogènes, cette capacité des BL à réduire la biodisponibilité, et donc la toxicité, de ces molécules ouvre à nouveau de nouvelles perspectives de recherche.

b. La bioremédiation des ETM par les bactéries

i. Mécanismes impliqués

Au-delà des applications concernant les xénobiotiques, la bioremédiation commence plus particulièrement à être étudiée pour limiter la toxicité des ETM. Ces ETM sont plus difficilement décontaminables car déjà sous forme atomique, et donc non dégradables contrairement à d'autres polluants tels que les pesticides par exemple. Certaines formes d'ETM, comme le méthyl-mercure, peuvent être transformées pour être moins toxiques mais l'élément mercure ne pourra jamais être totalement éliminé. La transformation n'est que l'un des nombreux mécanismes qui peuvent être utilisés par les bactéries pour détoxifier les ETM (Das *et al.*, 2008 ; Gupta et Joia, 2016) (Figure 15). On peut ainsi différencier des mécanismes actifs, nécessitant que les bactéries aient conservé leurs capacités métaboliques (bioaccumulation, détoxification par des enzymes, relargage de structures réactives), des mécanismes passifs (biosorption généralement).

La biosorption, aussi appelée adsorption, fait intervenir les groupements chargés à la surface des bactéries qui interagissent avec les ETM pour les séquestrer à la membrane. Ce mécanisme est donc particulièrement dépendant de nombreux facteurs comme (1) la concentration initiale en métal, (2) la concentration et le type de biomasse bactérienne, (3) le pH, et (4) le temps de contact. Le pH est l'un

des facteurs majeurs dans ce processus, car il peut modifier à la fois l'électronégativité des parois bactériennes mais aussi la biodisponibilité du métal en lui-même, et éventuellement apporter des ions H^+ qui pourraient entrer en compétition avec les ions métalliques pour l'interaction avec la paroi bactérienne (Das *et al.*, 2008 ; Topcu et Bulat, 2010 ; Kinoshita *et al.*, 2013).

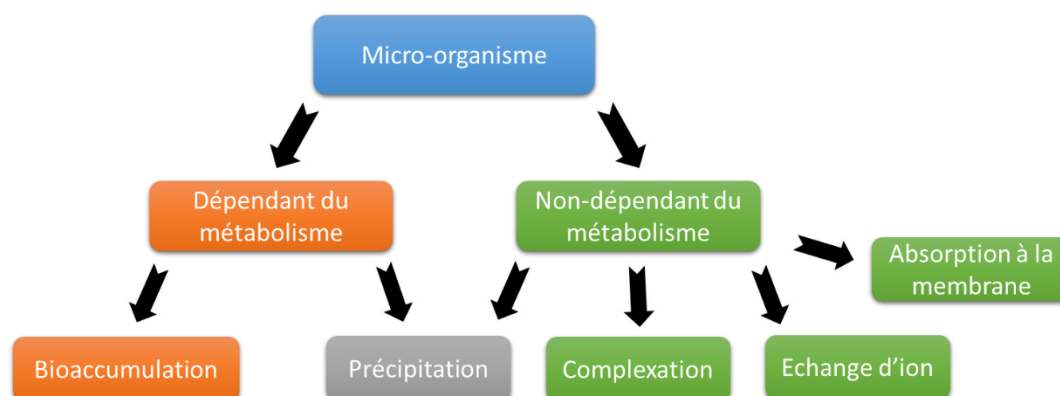


Figure 15 Les différents mécanismes de bioremédiation classés en fonction de leur dépendance ou non au métabolisme du micro-organisme. Modifié d'après Gupta et Joia, 2016.

Aussi, le caractère Gram positif et Gram négatif des bactéries influence la biosorption. En effet, les bactéries de type Gram positif ont une paroi très différente des Gram négatif (Figure 16). Elles possèdent des glycoprotéines de types protéoglycanes en proportion bien plus importante, qui représentent donc des sites d'interactions potentiels très nombreux avec les ions métalliques. Pour autant, les LPS présents chez les Gram négatif, et possédant des groupements carboxyles ou esthers, représentent des points d'ancrage possibles également, mais en moindre quantité en comparaison à l'abondance de peptidoglycane chez les Gram positif (Beveridge and Murray, 1980 ; Monachese *et al.*, 2012). La biosorption fait donc intervenir différents mécanismes en elle-même, comme de l'échange d'ion ou de la précipitation. Daisley *et al.* (2018) montrent ainsi la précipitation de grain de plomb à la surface de *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 (Figure A et B). Dans plusieurs études, la fixation du Pb, mais aussi du Cd, ne nécessite pas d'ATP car des bactéries inactivées sont aussi performantes que des bactéries vivantes (Topcu et Bulat, 2010 ; Zhai *et al.*, 2013 ; Daisley *et al.*, 2018). Kumar *et al.* ont photographié des *Lactobacillus* en présence et en absence de cadmium, et ont montré que du Cd est visible à la surface de la bactérie lorsqu'elle est mise en contact du métal (2017) (Figure 17).

Il a été montré que les mécanismes passifs peuvent être complétés par des mécanismes (plus) actifs, d'internalisation des ETM à l'intérieur de la cellule. Les transporteurs de métaux essentiels sont généralement impliqués dans ce transport vers la partie intra-cellulaire, probablement à cause de la très forte similarité de ces métaux essentiels avec les métaux toxiques. Daisley *et al.* montrent que *L.*

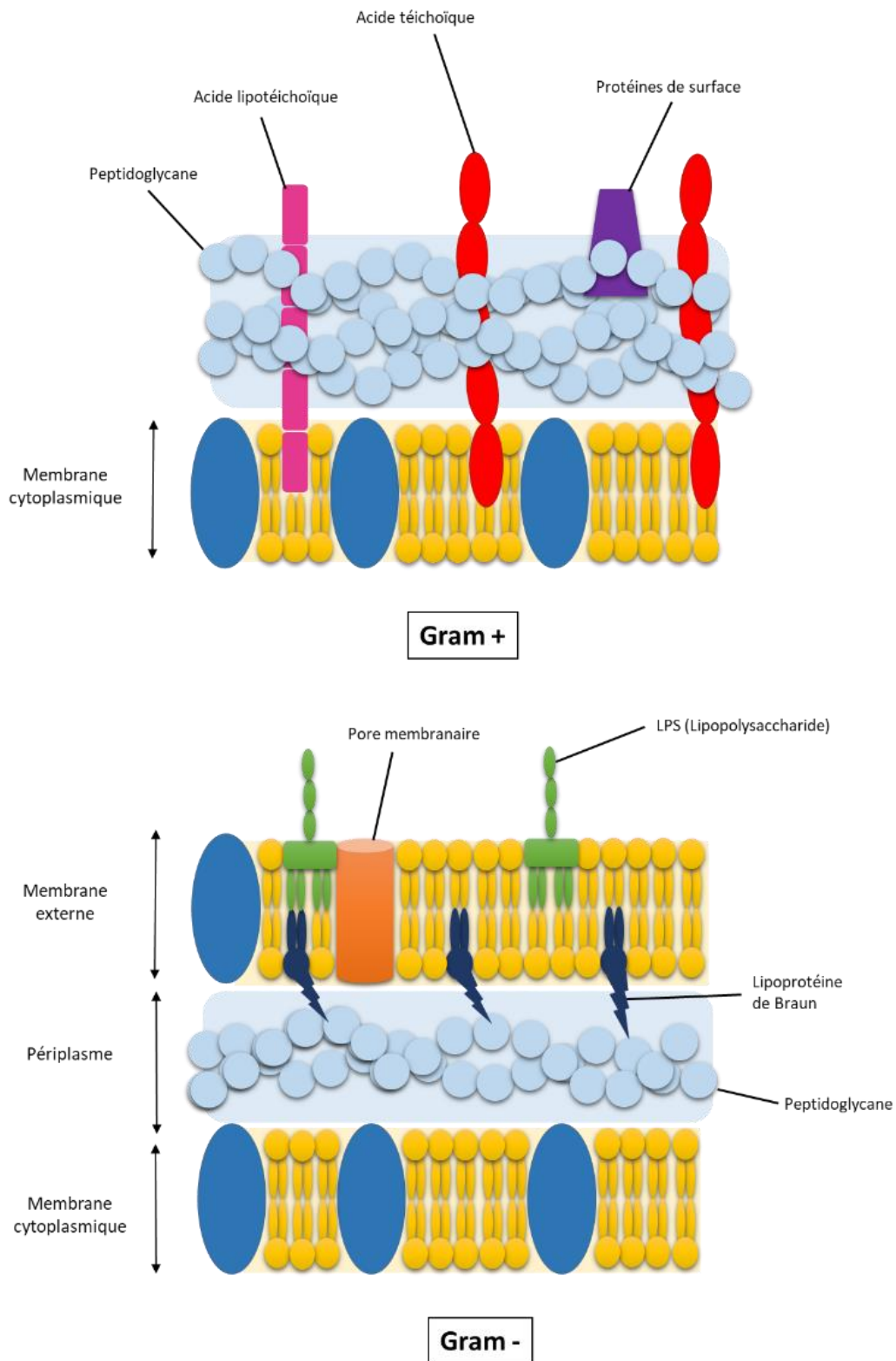


Figure 16 Schéma des parois bactériennes. En haut, paroi des Gram positif composée d'une membrane cytoplasmique et d'une épaisse couche de peptidoglycane. En bas, paroi des Gram négatif composée d'une membrane cytoplasmique surmontée d'un périplasm contenant une fine couche de peptidoglycane, puis d'une membrane externe. Des protéines particulières sont enchâssées dans les différentes membranes. Schémas personnels.

rhannosus GR-1 est capable d'internaliser le Cd dans son cytoplasme par des coupes ultra-fines analysées en MET (Daisley *et al.*, 2018) (Figure 18). Les mécanismes actifs peuvent aussi faire intervenir le relargage de structures réactives dans le milieu. Les EPS (*Extracellular Polymeric Substances*), structures saccharidiques relarguées dans le milieu par les bactéries, sont très réactives vis-à-vis des ions métalliques chargés positivement car fortement chargées négativement grâce à leurs groupements phosphate, succinate, ou encore pyruvate (Gerbino *et al.*, 2011 ; Lin *et al.*, 2019b).

ii. La bioremédiation des ETM

De nombreuses études *in vitro* ont été réalisées sur des souches bactériennes très diverses afin de trouver des bactéries chélatrices d'ETM. Kinoshita *et al.* (2013) se sont penchés sur les capacités de fixation de différents métaux (Cd(II), Pb(II), As(III) et Hg(II)) par des BL. Ils sont parvenus à détecter une protéine probablement impliquée dans la biosorption du mercure, mais dont la fonction reste inconnue. Pour autant, cette protéine contient un domaine riche en cystéine, domaine également retrouvé dans les métallothionéines responsables du maintien de l'homéostasie ionique des cellules et connues pour améliorer la captation du Cd chez *E. coli* (Kim *et al.*, 2011). L'intérêt de se pencher sur des BL, qui sont des constituants importants du microbiote intestinal, est supporté par l'étude de Breton *et al.* (2013) qui témoigne de l'importance du microbiote intestinal dans l'accumulation du cadmium et du plomb. Pour cela, les auteurs ont utilisé des souris axéniques, dépourvues de microbiote, et démontrent que ces souris accumulent davantage de métaux dans le sang et les organes que des souris normales : le microbiote intestinal joue donc un rôle particulièrement important dans la diffusion des ETM à travers la barrière intestinale.

La fixation du plomb et du cadmium peut être très rapide. Haltunen *et al.* (2007) ont testé la fixation de 10 ppm de Cd et de 50 ppm de Pb par différentes bactéries, et ont montré que respectivement 61,8-87,8 % et 30,2-92,6 % de métal était capté par les bactéries en seulement 5 minutes, avec peu de différences lors d'une plus longue incubation pour la plupart des souches (Haltunen *et al.*, 2007). Au-delà de nombreuses études *in vitro*, des études *in vivo* montrent que cette capacité de fixation des ETM peut être utilisée pour limiter leur biodisponibilité et leur toxicité subséquente. Quand des cellules Caco-2 sont exposées à du Cd après avoir été en contact avec la souche de *L. rhannosus* GR-1, leur survie est améliorée comparativement à celles n'ayant pas été mises en contact de bactéries (Daisley *et al.*, 2018). De même, en présence de cette souche, le passage apico-basal du Cd et du Pb est réduit comparativement aux cellules seules. Zhai *et al.* évaluent, quant à eux, l'effet protecteur d'une souche de *L. plantarum* (CCFM8610) sur la toxicité aigüe et chronique du Cd chez des souris (Zhai *et al.*, 2013 et 2014). Ils montrent ainsi une augmentation de la concentration en Cd dans les fèces et

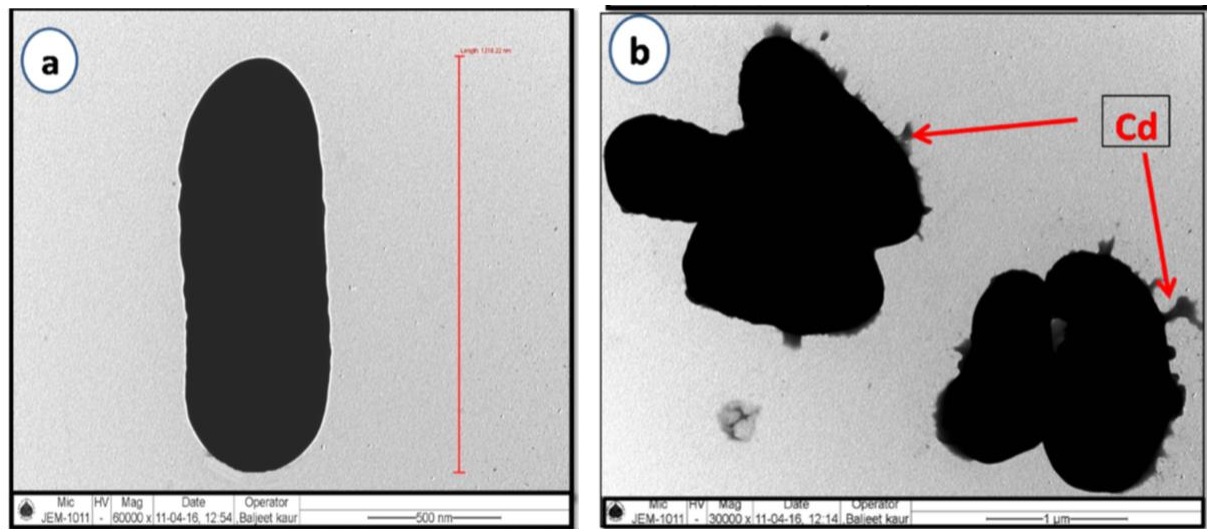


Figure 17 Précipitation du Cd au niveau de la membrane de *L. plantarum*. Image de microscopie électronique à transmission de (A) *L. plantarum* seule et (B) *L. plantarum* en contact de Cd. Le Cd précipite à la surface des bactéries (flèches). D'après Kumar *et al.*, 2017.

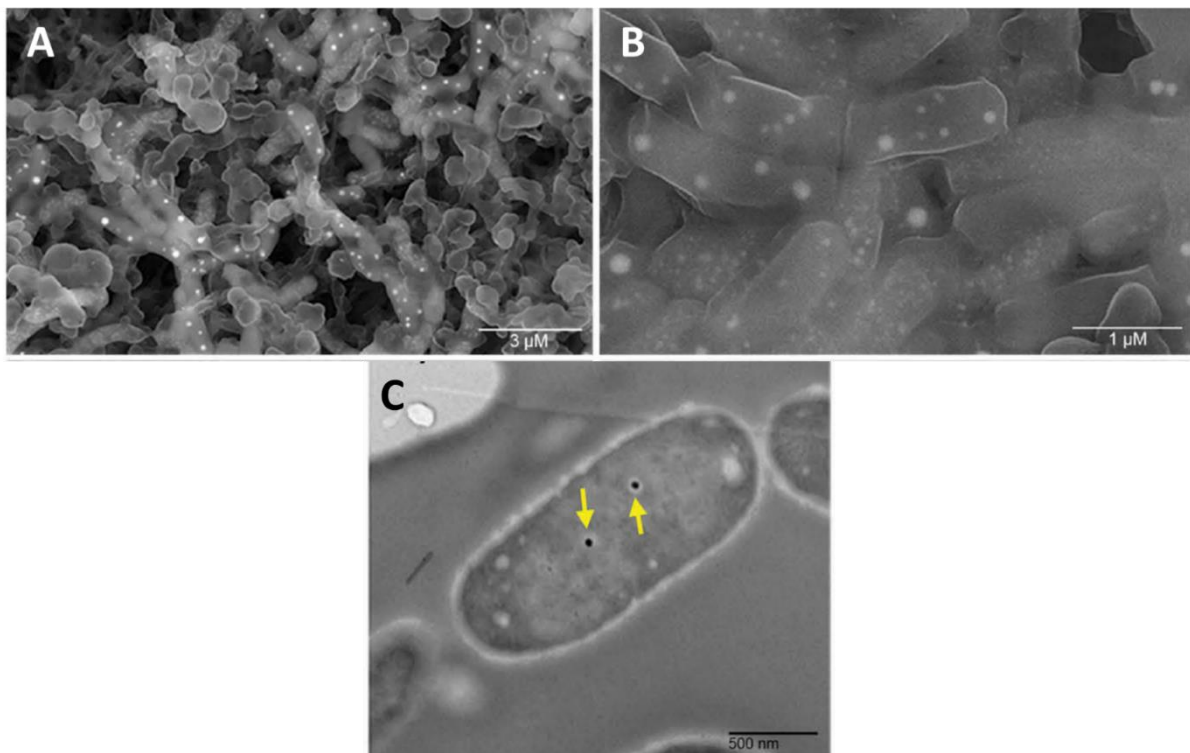


Figure 18 Séquestration du Pb et du Cd par *L. rhamnosus*. (A et B) Image de MEB de *L. rhamnosus* après incubation en présence de 0,1mM de Pb. Les grains de Pb apparaissent en surbrillance excitée par des rayons X. (C) Image de MET de *L. rhamnosus* après incubation en présence de 0,1 mM de Cd. Les flèches jaunes représentent des précipités de Cd dans le colloïde des bactéries. D'après Daisley *et al.*, 2018.

une réduction de cette concentration dans les reins et le foie des souris ayant reçu la souche, vivante ou inactivée (Zhai *et al.*, 2013). Cependant, seule la souche administrée vivante permet d'améliorer les scores histologiques hépatiques, avec une réduction de la nécrose hépatocytaire par exemple. Lors de leur étude sur la toxicité chronique du Cd, une plus forte excrétion du Cd dans les fèces est retrouvée, ainsi qu'une diminution de la concentration dans les organes quand les souris reçoivent le métal par voie orale (Zhai *et al.*, 2014). En revanche, le fait d'injecter le métal directement en intra-péritonéal annule tous les effets bénéfiques que pourrait avoir *L. plantarum*. De plus, les auteurs observent chez les souris exposées au Cd seul une altération de l'homéostasie des autres métaux (Ca, Zn, Fe et Mg), qui est restaurée par l'administration de la souche bactérienne. Dans cette étude, ils observent également une élévation de la quantité de métallothionéines présentes dans le foie avec l'administration seule de la bactérie. Cela suggère que, seule, la bactérie pourrait avoir des effets de protection contre la toxicité du Cd, qui passe notamment par l'induction d'un stress oxydatif. Les auteurs proposent ainsi un schéma résumant par quels moyens *L. plantarum* GR-1 pourrait agir contre la toxicité du Cd (Figure 19). Des effets similaires ont été retrouvés pour *L. plantarum* CCFM639 avec l'aluminium *in vitro* (Yu *et al.*, 2016), mais également *in vivo* chez le poisson tilapia (Yu *et al.*, 2017b).

Cette souche particulièrement intéressante a beaucoup été étudiée, et a même été utilisée pour une étude pilote chez l'humain. Dans cette étude réalisée sur une population de Tanzanie, 12 enfants et 21 femmes enceintes ont reçu un yaourt probiotique, contre 12 et 22 individus dans les groupes contrôles respectifs recevant du lait classique (Bisanz *et al.*, 2014). Il est à noter que les sujets de l'étude n'ont pas modifié leur alimentation, consistant principalement de poissons et crustacés contaminés : l'exposition aux ETM est donc poursuivie tout au long l'étude. Les auteurs retrouvent une élévation des concentrations en mercure et en arsenic dans le sang des groupes contrôles (lait classique), mais pas dans les groupes recevant le probiotique. Cela montre bien que les bactéries ne permettent pas de diminuer la quantité de métal déjà présente dans l'organisme en augmentant l'excrétion par exemple, mais permettent bien de lutter contre l'accumulation des métaux sur le long terme. Les bactéries limitent l'absorption des contaminants amenés quotidiennement par les aliments.

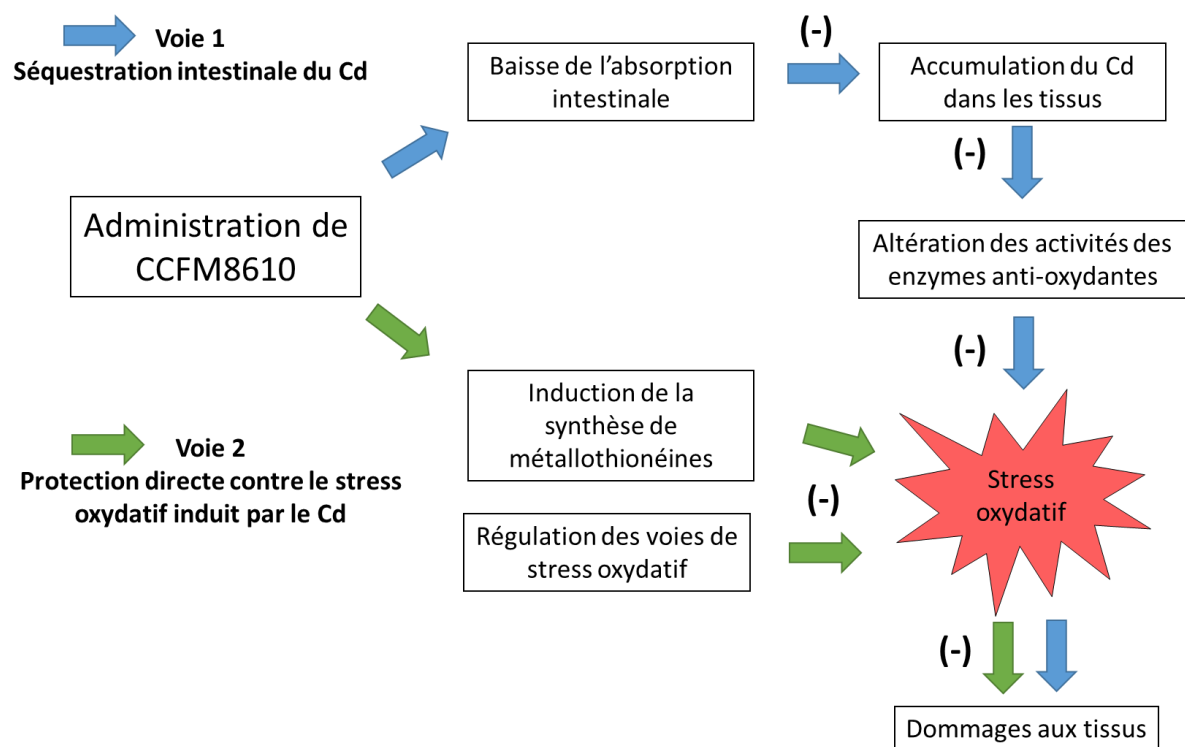


Figure 19 Schéma hypothétique des effets protecteur de la souche *L. plantarum* CCFM8610 contre la toxicité du Cd. Elle agirait *via* deux types de voies pour réduire *in fine* le stress oxydatif et les dommages causés aux tissus. D'après Zhai *et al.*, 2014.

Objectifs de la thèse

Les études de bioremédiation *in vitro* ou *in vivo* chez l'animal ouvrent un champ encore peu exploré de la lutte contre la toxicité des ETM *in vivo*, le but ultime étant de limiter l'absorption des ETM par l'organisme, en agissant directement au niveau de l'intestin. **L'objectif de cette thèse est d'explorer, de façon générale, les potentiels chélateurs de souches d'origines alimentaire et intestinale vis-à-vis de 3 contaminants métalliques (*i.e.* Pb, Cd et Al), afin de détecter des candidats potentiels pour le développement de nouvelles stratégies de lutte *in vivo* contre la toxicité de ces métaux. Il s'agira à la fois de sélectionner des souches à potentiels chélateurs distincts *in vitro* et d'éprouver leur efficacité dans des modèles *in vivo* simples (*C. elegans*) ou plus intégrés (souris)**

Au cours de cette étude, nous avons évalué les capacités de chélation du Pb(II), du Cd(II) et de l'Al(III) d'une collection de 225 souches bactériennes d'origines très diverses. Parmi ces souches, on retrouve 93 BL et 91 Entérobactéries, représentant des phylums majeurs du microbiote intestinal. La plupart des BL font partie des collections ATCC et DSM, et sont particulièrement bien caractérisées génétiquement car précédemment utilisées dans une étude de génomique comparative (Sun *et al.*, 2015). Pour compléter ce panel, 21 *Propionibacterium*, 4 *Cutibacterium*, 11 *Bifidobacterium*, ainsi que 4 *Staphylococcus* ont été ajoutées. Si la plupart des souches utilisées ont des caractères plutôt bénéfiques pour l'hôte, certaines ont des caractères plus pathogènes (*S. aureus*, *E. coli* AIEC/NRG857c/LF82, *Serratia* spp) et nous permettent également d'appréhender le pouvoir chélateur des bactéries intestinales dans sa globalité.

Le cheminement généralement employé dans la littérature est la sélection d'une ou plusieurs souches fortement résistante(s) à un métal, l'évaluation des capacités de fixation du contaminant en question *in vitro* puis *in vivo* chez la souris. Nous avons suivi un cheminement similaire, bien que dans notre travail, toutes les souches ont subi le criblage *in vitro*, et seule une petite sélection de souches à forts et à faibles potentiels chélateurs ont pu être évaluées *in vivo*.

Le recours à l'utilisation du nématode *Caenorabditis elegans* comme modèle d'évaluation a également été exploré et sera succinctement présenté.

Par ailleurs, de façon quelque peu fortuite, durant ce criblage *in vitro* de notre collection bactérienne, un effet particulier du Tween 80 sur le potentiel chélateur des bactéries de type *Propionibacterium* vis-à-vis du plomb a été mis en évidence. Une partie exploratoire de cet effet est développée dans le dernier chapitre de cette thèse.

Chapitre 1 : *Criblage in vitro* de
bactéries alimentaires et intestinales
pour la bioremédiation des ETM

Matériel et méthodes

I. Souches et cultures bactériennes

Bactéries lactiques : Les souches de bactéries lactiques forment une collection de souches DSM et ATCC bien documentée, et utilisée dans une étude de génomique comparative de 2014 (Sun *et al.*, 2014) (Tableau 4). Elles sont cultivées dans du milieu de De Man, Rogosa, and Sharp (MRS) (Becton, Dickinson and Company, Le Pont de Claix, France) dans des conditions aérobies, à leur température de culture optimale (30°C ou 37°C). Pour les expériences d'ajout de Tween 80, les bactéries sont cultivées dans du milieu MRS sans Tween (Sigma-Aldrich Chemical, St Quentin Fallavier, France), auquel peut être ajouté du Tween 80 à la concentration souhaitée.

Propionibacterium : Les souches de *Propionibacterium* ont été obtenues par le biais du Centre International de Ressources Microbiennes – Bactéries d'Intérêt Alimentaire (CIRM-BIA ; STLO, INRAe, Rennes, France). Ces dernières ont été précédemment caractérisées dans une étude comparative pour leur potentiels immunomodulateurs (Foligné *et al.*, 2013). Elles sont cultivées dans du milieu Yeast Extract Lactate (YEL) (Malik *et al.*, 1968), contenant ou non du Tween 80 (0,1 %), dans des conditions micro-aérophiles à 30°C.

Entérobactéries : Les souches d'*E. coli* proviennent de la collection ECOR, qui répertorie des souches de références d'une grande variété d'hôtes et de régions géographiques (Ochman and Selander, 1984). Elle nous a été fournie par le Dr Laurent Debarbieux (Institut Pasteur Paris). D'autres souches d'*E. coli* ont été décrites par Rahmouni *et al.* (2018) et caractérisées, pour certaines, comme étant des pathovars adhérents et invasifs (AIEC).

Les souches de *Serratia marcescens* (Db10, Jub9, SM25, SM38, SM45) nous ont été fournies par le Dr Elizabeth Pradel (Pradel *et al.*, 2007).

Les souches d'*Hafnia alvei* (Gb01, E215, 920 et Grignon) ont été décrites par Adouard *et al.* (2015) à l'occasion d'une collaboration antérieure avec l'INRAe (UMR GMPA).

Les souches d'*Enterobacter*, *Klebsiella* et certaines *Hafnia alvei* proviennent de prélèvements intestinaux ou fécaux d'origine humaine, et font partie de la collection interne à la Faculté de Pharmacie de Lille (FPL, Université de Lille). Ces souches ont été sélectionnées et isolées grâce à des milieux sélectifs, et l'espèce ensuite confirmée par spectrométrie de masse (Ultraflex III MALDI-TOF/TOF, Bremen, Allemagne). Elles sont toutes cultivées dans le milieu Luria Bertani-Miller (LB-Miller) (Becton, Dickinson and Company, Le Pont de Claix, France) à 37°C en condition statique.

Autres souches : Quelques souches de *Bifidobacterium*, ainsi que les *Cutibacterium acnes* font partie de la collection FPL : elles ont une origine alimentaire, ou ont été ré-isolées de probiotiques

Tableau 4 Nom, température optimale de culture, année d'isolement et prélèvement d'isolement des LAB utilisées dans ma thèse. Bibliothèque de souches issues de l'étude de Sun *et al.*, 2014

Souche	T°opt de culture	Année d'isolement	Prélèvement d'origine
<i>L. reuteri</i> DSM 20016	37	1982	Intestin d'adulte
<i>L. murinus</i> DSM 20452	37	1982	Intestin de rat
<i>L. salivarius</i> DSM 20555	37	1953	Salive
<i>L. gallinarum</i> DSM 10532	37	1992	Cuisse de poulet
<i>L. intestinalis</i> DSM 6629	37	1974	Intestin de rat
<i>L. vini</i> DSM 20605	37	2006	Moût de raisin
<i>L. plantarum</i> DSM 13273	37	1919	Fermentation d'un repas à base de Jojoba
<i>L. mucosae</i> DMS 13345	37	2000	Intestin grêle de cochon
<i>L. equicursoris</i> DSM 19284	37	2010	Cheval de course pur-sang sain
<i>L. amylophilus</i> DSM 20534	30	2006	Fermentation de restes de porc
<i>L. concavus</i> DSM 17758	37	2005	Murs d'une cave de distillerie de spiritueux
<i>L. composti</i> DSM 18527	30	2007	Matière de compostage de résidus de sochu (eau de vie japonaise)
<i>L. harbinensis</i> DSM 16991	37	2006	Légumes traditionnels chinois fermentés
<i>L. manihotivorans</i> DSM 13343	30	1998	Fermentation d'amidon de manioc
<i>L. paracasei</i> DSM 5622	30	1989	non indiqué
<i>L. casei</i> DSM 20011	30	1916	Fromage
<i>L. brantiae</i> DSM 23927	37	2012	Fèces d'oie canadienne
<i>L. thailandensis</i> DSM 22698	37	2007	Fermentation de feuilles de thé (miang)
<i>L. pantheris</i> DSM 15945	37	2002	Fèces de jaguar
<i>L. selangorensis</i> DSM 13344	30	2000	Chili bo
<i>L. animalis</i> DSM 20602	37	1983	Plaque dentaire de babouin
<i>L. apodemi</i> DSM 16634	37	2006	Fèces de souris des bois japonaise sauvages
<i>W. confusa</i> DSM 20196	30	1969	Canne à sucre
<i>L. senioris</i> DSM 24302	37	2012	Fèces d'une femme japonaise saine âgée de 100 ans
<i>P. claussenii</i> DSM 14800	30	2002	Bière gâtée
<i>P. ethanolidurans</i> DSM 22301	37	2006	Murs d'une cave de distillerie de spiritueux
<i>L. nasuensis</i> DSM 26653	30	2012	Ensilage de sorgho du Soudan
<i>Le. mesenteroides</i> DSM 20343	30	1990	Olives fermentées
<i>L. farciminis</i> DSM 20184	30	1970	Saucisson

Souche	T°opt de culture	Année d'isolement	Prélèvement d'origine
<i>L. alimentarius</i> DSM 20249	30	1970	Poisson mariné
<i>L. paralimentarius</i> DSM 13238	30	1999	Levain
<i>L. kimchiensis</i> DSM 24716	27	2013	Kimchi (repas traditionnel coréen)
<i>L. floricola</i> DSM 23037	30	2011	Fleur de <i>Caltha palustris</i> (Populage des marais)
<i>L. delbrueckii</i> DSM 20081	30	1919	Yaourt bulgare
<i>L. bifermentans</i> DSM 20003	30	1943	Fromage gonflé
<i>L. aquaticus</i> DSM 21051	37	2009	Surface d'un étang d'eau douce
<i>L. nagelii</i> DSM 13675	30	2000	Vin partiellement fermenté
<i>L. similis</i> DSM 23365	37	2010	Mélasse de canne fermenté dans des usines d'alcool
<i>L. acidophilus</i> DSM 20079	37	1900	Humain
<i>C. maltaromaticum</i> LMA28	30	1974	Viande en sachet sous vide
<i>C. maltaromaticum</i> ATCC35586	30	1974	Truite arc-en-ciel malade
<i>C. maltaromaticum</i> WN1359	30	2014	Permafrost sibérien
<i>C. maltaromaticum</i> V41	30	1984	Bœuf haché sous vide
<i>L. amylophilus</i> DSM 20533	30	1981	Fermentation de viande de porc
<i>L. hokkaidonensis</i> DSM 26202	27	2013	Ensilage de fléole des prés
<i>F. fructosus</i> DSM 20349	30	1956	Fleurs
<i>L. panis</i> DSM 6035	37	1996	Levain
<i>L. florum</i> DSM 22689	30	2010	Pivoine arbustive
<i>L. senmaizukei</i> DSM 21775	30	2008	Senmaizuke (concombre japonais)
<i>L. fuchuensis</i> DSM 14340	20	2002	Bœuf sous vide
<i>L. rennini</i> DSM 20253	30	2006	Présure (isolé de l'estomac de ruminants)

commerciaux (Bb12 et Morinaga). Les Bifidobactéries sont cultivées dans du MRS supplémenté avec 0,1 % (v/v) de L-cystéine, en condition anaérobie grâce aux générateurs d'anaérobiose GENbaganaer (Biomérieux, France) à 37°C. Les cutibactéries sont également cultivées en anaérobiose, à 37°C dans du milieu YEL.

II. Solutions de métaux et produits chimiques

La plupart des produits chimiques utilisés au cours de cette thèse proviennent de chez Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France) : PbCl_2 (n° CAS : 7758-95-4), CdCl_2 (n° CAS : 654054-55-7), AlCl_3 (n°CAS : 7446-70-0), FUDR (ou fluxoridine ; n° CAS : 50-91-9). Les sels de métaux sont mis en suspension dans de l'eau milliQ afin d'obtenir des solutions mères. Leur concentration est ensuite vérifiée par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (Thermo ICAP Q, Thermo Fisher Scientific ; Illkirch, France). Du Tween 80 (VMR Chemicals, Solon, USA) est ajouté au milieu de culture ou de façon extemporanée lorsque nécessaire.

III. Evaluation des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Préparation des milieux solides contenant les métaux : Des dilutions sériées d'une solution-mère de plomb et de cadmium à une concentration de 500 ppm sont réalisées. Un mL de chacune des dilutions est ajouté à 19 mL de milieu MRS, ensuite coulé en boîte de Pétri, permettant d'obtenir une gamme de concentration des métaux dans les géloses. La gamme de concentration pour le plomb s'étend de 0,001 à 100 ppm. Elle s'étend de 0,0005 à 55 ppm pour le cadmium.

Ensemencement des géloses contenant les métaux : Les cultures bactériennes sont calibrées à environ 10^5 UFC/mL, et ensemencées sur les boîtes de Pétri à l'aide d'un inoculateur à têtes multiples, ou appareil de Steers (Mast LaboratoryTM, Angleterre) (Figure 20A) qui permet le dépôt de 36 souches simultanément. Après 24 à 48h d'incubation à 30°C ou 37°C, la présence ou l'absence de colonies à la surface de la boîte est observée (Figure 20B). La CMI est caractérisée comme étant la plus faible concentration en métal permettant l'inhibition de croissance des souches bactériennes.

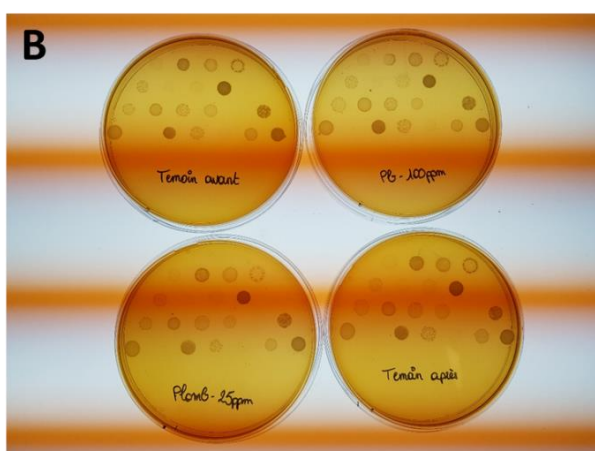
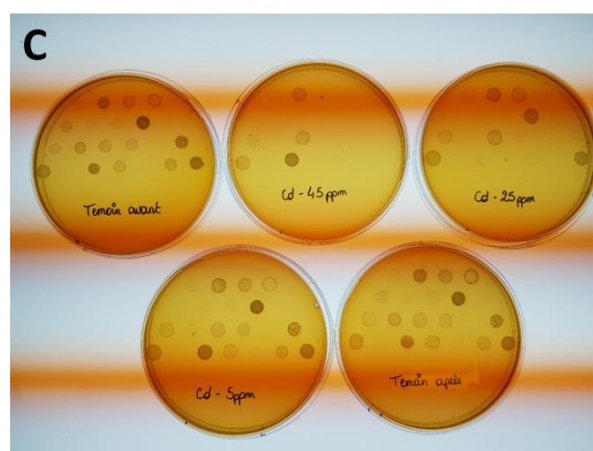
A**B****C**

Figure 20 Illustration de la méthode du Steers. (A) Appareil de Steers. (B) Exemple de boîtes de MRS contenant du plomb, ainsi que les témoins d'inoculation (avant/après manipulation) après 48 h d'incubation. (C) Exemple de boîtes de MRS contenant du cadmium, ainsi que les témoins d'inoculation (avant/après manipulation) après 48 h d'incubation. On observe des spots disparaître avec l'augmentation de concentration en Cd.

IV. Courbes de croissance en présence des métaux

La courbe de croissance permet d'évaluer l'effet d'un composé, ici les sels de métaux en suspension, sur la croissance bactérienne. Elle permet d'apporter des données complémentaires à la CMI quant aux effets des métaux en concentrations sub-inhibitrices.

Préparation des cultures bactériennes : Des précultures sont réalisées en cultivant les souches bactériennes en milieu MRS pendant 24h. Ces précultures sont diluées afin de calibrer la densité bactérienne à environ 10^5 UFC/mL dans les tubes de culture, contenant ou non du métal. Le nombre de bactéries de l'inoculum de départ est évalué par l'étalement de cette culture sur boîte MRS, et comptage des bactéries après 24h de culture à 30°C ou 37°C.

Préparation du milieu contenant les métaux : Les solutions mères de plomb et de cadmium sont diluées dans le milieu MRS afin d'obtenir des concentrations finales de 25 ppm et 50 ppm pour le plomb ; et 2,5 ppm, 5 ppm, 25 ppm et 50 ppm pour le cadmium. Les concentrations en métaux à ajouter au milieu de culture sont calculées de sorte que le métal, en suspension dans de l'eau mQ, n'excède pas 20 % du volume final afin de ne pas trop diluer le milieu de culture. Un témoin où est ajouté de l'eau mQ à hauteur de 20 % permet d'attester du fait que l'eau, et la dilution du milieu, n'ont aucun effet secondaire sur la croissance bactérienne.

Courbes de croissance : Le suivi de la croissance bactérienne est réalisé par ensemencement d'un échantillon de culture à des temps donnés, jusque 24h à 30h. Pour cela, 100 µL de culture sont prélevés à chaque temps, puis dilués en série dans de la solution de Ringer (Merck™, Allemagne) en fonction du développement bactérien, évalué à l'œil. Afin d'obtenir un nombre de colonies par boîte compris entre 15 et 300, 100 µL des trois dernières dilutions sont ensemencées sur boîte MRS.

A chaque temps, 100 µL sont prélevés à partir de 10mL de culture de départ, dilués avec 900 µL de solution de Ringer : on obtient alors un seuil de détection minimum d'environ 1 log UFC/mL. On considère alors que, si aucune colonie n'est détectée sur les boîtes après 48h de culture, on se trouve en-dessous de ce seuil. (Figure 21)

Remarque : Le suivi de la croissance est classiquement réalisé au laboratoire par prélèvements aux temps T0, T2, T4, T6, T8 et T24. Les premières courbes de croissance ont donc été faites sur ce même protocole, établi pour des souches d'*Escherichia coli* ou de *Staphylococcus aureus*. Les bactéries lactiques ayant une phase de latence plus prononcée, nous avons donc réévalué les temps de prélèvements à T0, T4, T8, T24, T26, T28 et T30.

V. Evaluation des capacités de captation des métaux *in vitro*

Calibration de la densité bactérienne : Toutes les souches ont été cultivées afin d'atteindre leur phase stationnaire de croissance.

Les cultures bactériennes sont centrifugées à 1 700 *xg* pendant 10 minutes. Les culots sont ensuite lavés avec de la solution de Ringer pH 7 (Merck™, Allemagne). Les culots sont resuspendus dans la solution de Ringer, et les densités optiques calibrées sur un spectrophotomètre afin d'obtenir une biomasse bactérienne de densité optique $DO_{600nm} = 2,5$. (Figure 22)

Mise en contact des bactéries et du métal : Une quantité donnée de solution de métal est ajoutée aux suspensions bactériennes en fonction de la concentration de la solution-mère, afin d'obtenir une

concentration finale en métal de 25 ppm de Pb, d'Al, ou de 25 ppm et 1 ppm de Cd dans volume final de 8 mL d'échantillon. Les échantillons sont mis en agitation rotative douce (12 rpm) à température ambiante ou 37°C. Ils sont ensuite centrifugés 10 min à 1 700 xg, 20 °C. Les surnageants sont éliminés, et les culots bactériens subissent deux lavages successifs avec du Ringer pH 7. Le dernier surnageant est éliminé, et les culots conservés semi-secs à 4°C jusqu'au dosage des métaux par ICP-MS. Les témoins sont constitués de 8 mL de suspension bactérienne uniquement, et subissent les mêmes lavages que les échantillons contenant du métal.

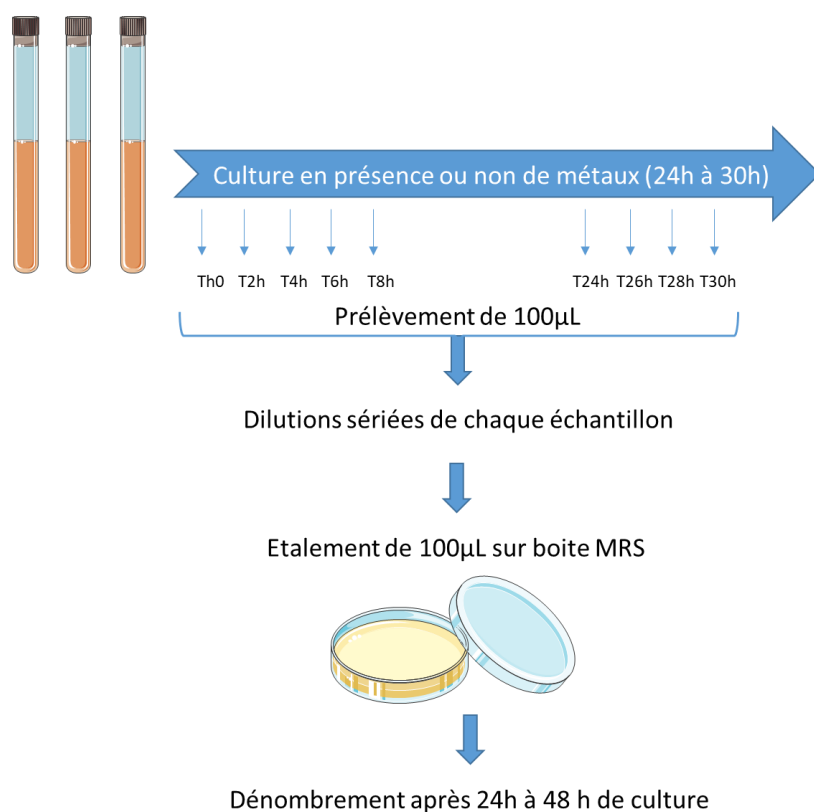


Figure 21 Protocole expérimental de la détermination des courbes de croissance. Des prélèvements des cultures en présence/absence des métaux est effectuée à des temps donnés, dilués puis ensemencés sur boîte de Pétri contenant du milieu MRS.

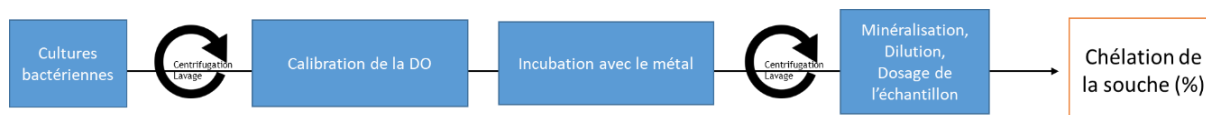


Figure 22 Schéma expérimental pour l'évaluation des capacités de chélation des métaux *in vitro*. Les cultures bactériennes sont stoppées par centrifugation, lavées par de la solution de Ringer, puis la DO est calibrée à 2,5. Les bactéries sont ensuite incubées en présence du métal pendant 1 h, puis les culots lavés avant d'être minéralisés pour dosage par ICP-MS. La quantité de métal retrouvée est comparée à la quantité mise en contact au départ.

VI. Dosage par ICP-MS

Minéralisation et dosage : Les culots bactériens sont minéralisés par l'ajout de 500 µL d'acide nitrique 69 % (VWR Chemicals, France), puis chauffés 15 min à 98°C. Les échantillons obtenus sont dilués (eau milliQ, acide nitrique, butanol, triton) pour analyse des métaux par ICP-MS (Thermo ICAP Q, Thermo Fisher Scientific ; Illkirch, France). La quantité de métal restant dans les culots lavés est mesurée pour chacune des souches bactériennes, et convertie en *ratio* rapporté à la quantité de métal initialement présente dans le milieu.

Contrôles : Les échantillons sont accompagnés de contrôles internes (contrôle urinaires ClinCheck Control pour les éléments traces), permettant de s'assurer du bon fonctionnement des dosages tout au long de la manipulation. Les limites basses de quantification sont de 0,2 µg/L, 0,05 µg/L, et 2 µg/L pour le plomb, le cadmium et l'aluminium respectivement.

Pour certaines souches, les surnageants ainsi que les liquides de lavage suivant la mise en contact des bactéries et des métaux ont été récupérés et dosés séparément. Les surnageants ont été dilués au demi dans de l'HNO₃ 69 %, chauffés 15 min à 98°C, puis dilués de la même façon que les échantillons bactériens afin d'être dosés par la même méthode d'ICP-MS.

VII. Statistiques

Les statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism 8. Un t-test a été utilisé pour la comparaison des chélations du Pb par différentes souches d'*Hafnia* (Figure 28). Un test 2-Way ANOVA à comparaisons multiples a servi pour les données de mélanges de métaux. Les données des mélanges ont toujours été comparées au métal seul, qui sert de contrôle (Figure 33 à 35).

Résultats expérimentaux

I. Evaluation de l'impact des métaux sur la viabilité des bactéries

1. Détermination des concentrations minimales inhibitrices des métaux

Sur la base d'une étude de la bibliographie et des stratégies généralement employées, et dans le but d'un premier *screening*, les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des métaux vis-à-vis de

certaines souches sont déterminées. A des fins d'automatisation et d'optimisation du temps, un inoculateur à têtes multiples, ou appareil de Steers, est utilisé. Grâce à cette méthode, 36 souches peuvent être inoculées simultanément sur une boîte de Pétri unique. Des concentrations croissantes en Pb et en Cd sont diluées et homogénéisées dans le milieu gélosé (ici du MRS). Des boîtes ne contenant pas de métal sont égalementensemencées en début et fin de manipulation afin de s'assurer du bon déroulement de l'inoculation tout au long de l'expérience. Les suspensions bactériennes utilisées sont calibrées à environ 10^5 UFC/mL. Une foisensemencées, les boîtes de Pétri sont mises en incubation à 30°C ou 37°C pendant 48h. La lecture des boîtes consiste à noter la présence ou l'absence de culture bactérienne au niveau du dépôt après incubation : la plus faible concentration de métal capable d'inhiber la croissance bactérienne correspond à la CMI (Figure 20).

Le Pb est testé sur une gamme de dilution allant de 0,001 ppm à 100 ppm en diluant la concentration en métal par deux entre chaque boîte de Pétri. Le Cd est testé sur une gamme de concentration de 0,0005 à 55 ppm. Aucun test n'a été réalisé sur l'aluminium.

La plupart des bactéries lactiques (85 souches) ont été évaluées dans ce contexte. Elles se sont toutes avérées résistantes à la concentration de 100 ppm de plomb lors des 3 réplicas. Leur CMI vis-à-vis du cadmium sont, en revanche, très différentes d'une souche à l'autre (Tableau 5). Même si les CMI du Cd sont hétérogènes, elles restent néanmoins toutes supérieures à la concentration de métal que nous utilisons dans le *screening* de chélation dans la suite de cette étude ; il en est de même pour le Pb.

2. Evaluation de l'effet des métaux sur la croissance des bactéries en milieu liquide

Pour accompagner ces résultats, et approfondir la compréhension de l'effet potentiel des métaux sur le métabolisme et la croissance des bactéries, nous avons procédé à des courbes de croissance en milieu liquide. Un effet bactériostatique d'un composé donné peut être défini comme inhibant la croissance des bactéries, sans pour autant les tuer. Au contraire, un effet bactéricide est décrit comme tuant les bactéries : on considère un produit comme bactéricide s'il est capable d'induire une baisse significative de la quantité bactérienne, c'est-à-dire 5 log environ. Différentes concentrations de Pb(II) et de Cd(II) sont testées sur des bactéries lactiques en culture dans du MRS.

Le plomb, que ce soit à la concentration de 25 ppm ou de 50 ppm, n'affecte absolument pas la croissance des souches testées, ici *L. paracasei* DSM 5622, *L. koreensis* DSM 27983, *L. acidophilus* NCFM, *L. rennini* DSM 20253 et *L. rhamnosus* NCC 3003 (GG) (Figure 23 et Figure 24). On observe donc que le plomb n'a aucun effet sur la croissance même à la plus forte concentration testée, ici 50 ppm.

Cela semble corrélér avec les CMI puisque les souches sont toutes résistantes à la concentration de 100 ppm.

Tableau 5 Quelques BL associées à leur CMI du Cd (ppm). Les CMI ont été déterminées par la méthode du Steers. Les CMI sont déterminées par une moyenne de 3 expériences par la méthode du Steers.

Souche	CMI du Cd (ppm)	Souche	CMI du Cd (ppm)	Souche	CMI du Cd (ppm)
Le. mesenteroides DSM 20343	6,9	L. diolivorans DSM 14421	26,67	L. intestinalis DSM 6629	47
L. delbrueckii DSM 20081	6,9	L. brevis DSM 20054	26,67	L. harbinensis DSM 16991	47
L. concavus DSM 17758	9,75	L. nasuensis DSM 26653	27,5	L. pantheris DSM 15945	47
L. mucosae DMS 13345	11	L. plantarum DSM 13273	27,67	L. nantensis DSM 16982	47,67
L. ingluviei DSM 15946	11	L. casei DSM 20011	27,67	L. aquaticus DSM 21051	48,5
P. inopinatus DSM 20285	11	L. thailandensis DSM 22698	28,67	L. alimentarius DSM 20249	49,5
C. maltaromaticum V41	14	L. hordei DSM 19519	28,67	L. farciminis DSM 20184	52,5
L. panis DSM 6035	14	C. maltaromaticum DSM 20342	29	L. diolivorans DSM 14421	52,5
L. acidophilus NCFM	14	L. senmaizukei DSM 21775	29	W. halotolerans DSM 20190	53,33
L. composti DSM 18527	16,5	L. capillatus DSM 19910	29,5	L. gallinarum DSM 10532	> 55
L. selangorensis DSM 13344	16,5	L. kimchiensis DSM 24716	30,5	L. equicursoris DSM 19284	> 55
P. acidilactici DSM 19927	17,33	L. nodensis DSM 19682	31,33	L. brantae DSM 23927	> 55
P. ethanolidurans DSM 22301	17,67	L. sharpae DSM 20505	31,33	W. confusa DSM 20196	> 55
W. viridiscens DSM 20410	18	L. fermentum DSM 20055	31,5	L. hominis DSM 23910	> 55
L. versmoldensis DSM 14857	18,33	L. perolens DSM 12744	31,5	L. koreensis DSM 27983	> 55
L. pentosus DSM 20314	18,33	L. paralimentarius DSM 13238	32,33	L. acidophilus DSM 20079	> 55
L. rennini DSM 20253	19	L. animalis DSM 20602	33	C. maltaromaticum LMA28	> 55
L. paracasei NCC 2461	19	L. sakei DSM 20017	33	C. maltaromaticum ATCC35586	> 55
L. bifermentans DSM 20003	19,25	L. reuteri DSM 20016	33,33	F. fructosus DSM 20349	> 55
L. hammesii DSM 16381	20,33	L. murinus DSM 20452	33,5	L. salivarius Ls-33	> 55
L. senioris DSM 24302	20,75	L. satsumensis DSM 16230	34,5	L. rhamnosus Lr-32	> 55
L. amylophilus DSM 20534	22	L. paracasei DSM 20258	35,75	L. rhamnosus NCC 3003 (GG)	> 55
L. cacaonum DSM 21116	22	L. namurensis DSM 19117	36	L. rhamnosus ATCC 9595	> 55
L. similis DSM 23365	22	L. paracasei DSM 5622	37,67	L. plantarum Lp-115	> 55
L. manihotivorans DSM 13343	23	L. rapi DSM 19907	39	L. casei BL23	> 55
L. amylophilus DSM 20533	23,5	P. clausenii DSM 14800	41,67	L. johnsonii NCC 533	> 55
L. vini DSM 20605	25	L. parabuchneri DSM 15352	42,5	Lc. lactis MG1363	> 55
P. parvulus DSM 20332	25	L. florum DSM 22689	44,5		
L. nagelii DSM 13675	25	L. apodemi DSM 16634	45,33		

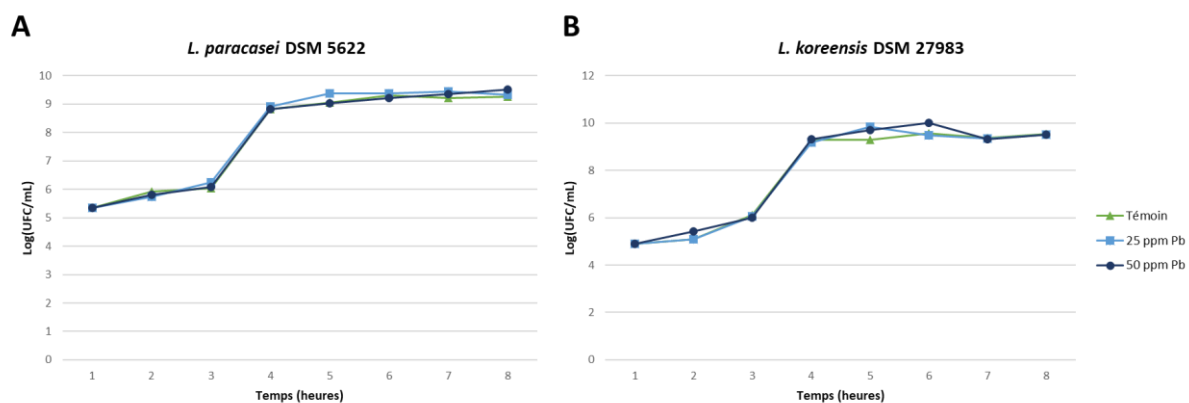


Figure 23 Effet du plomb sur la croissance de (A) *L. paracasei* DSM 5622 et (B) *L. koreensis* DSM 27983. Les concentrations de 25 et 50 ppm de Pb ont été testées.

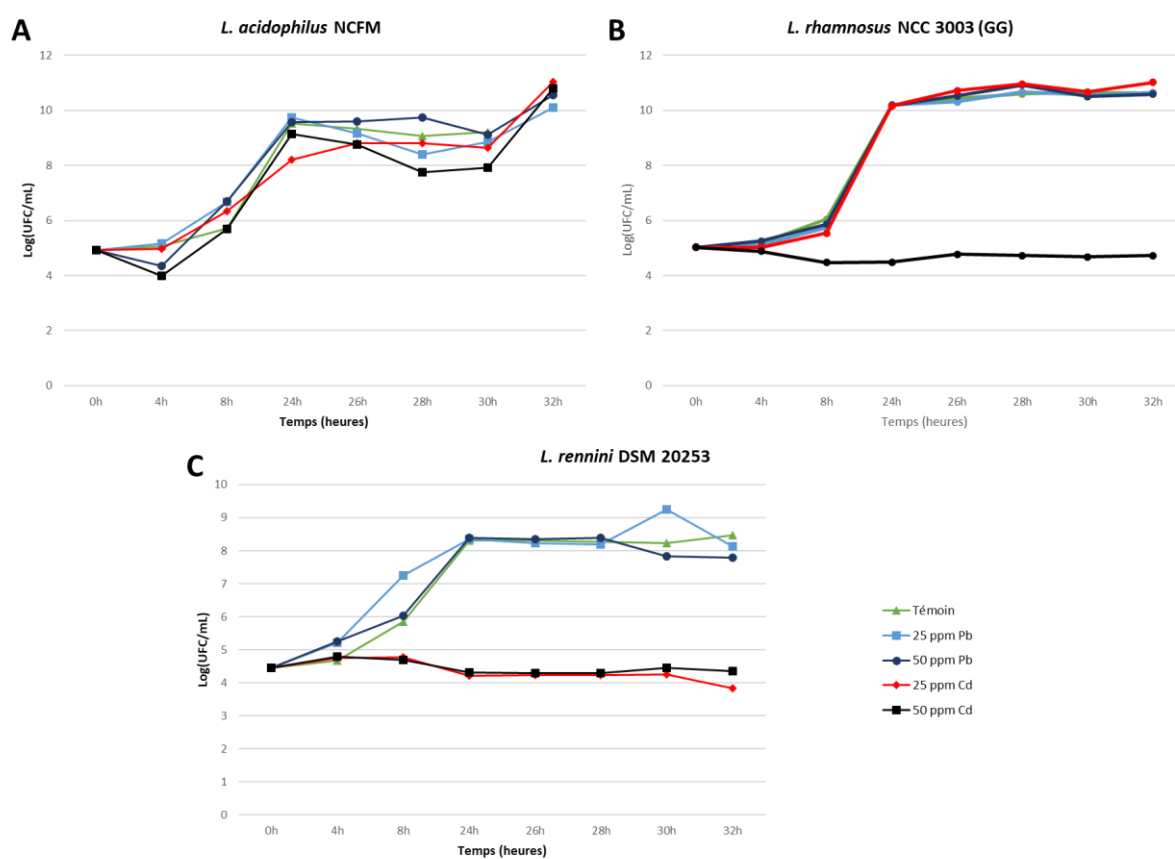


Figure 24 Effet du Pb et de fortes concentrations de Cd sur la croissance de (A) *L. acidophilus* NCFM, (B) *L. rhamnosus* NCC 3003 (GG), et (C) *L. rennini* DSM 20253. Les concentrations de 25 et 50 ppm de Pb et de Cd ont été testées.

Le Cd a quant à lui des effets très différents en fonction de la concentration et de l'espèce bactérienne considérée. *L. acidophilus* ne semble pas du tout affecté par la présence de Cd, même à la plus forte concentration de 50 ppm (Figure 24A). *L. rhamnosus* NCC 3003 (GG) croît de la même façon que la condition témoin en présence de 25 ppm de Cd (Figure 24B). En revanche, la concentration de 50 ppm de Cd a un effet bactériostatique. Au contraire, *L. rennini* est affecté par la présence de Cd à 25 ppm et 50 ppm : un effet bactériostatique est observé pour les deux concentrations (Figure 24C). La concentration de 50 ppm a un effet bactériostatique sur la croissance de *L. mesenteroides* DSM 20343 également (Figure 25A). De manière étonnante, la concentration de 25 ppm de Cd semble avoir le même effet jusqu'à 8h de contact : la croissance reprend après ce temps, pour atteindre la même quantité bactérienne que le témoin après 30h de culture. On note que les faibles concentrations en Cd (2,5 ppm et 5 ppm) n'ont aucun effet délétère sur la croissance de la bactérie. Un effet de reprise de croissance est également observable pour *L. salivarius* Ls-33 (Figure 25B). Même les très faibles concentrations sont ici bactériostatiques, et une reprise de la croissance est observée après 8h de culture. Ce retard est plus ou moins prononcé en fonction de la concentration bactérienne. Après 30h de culture, seule la concentration de 2,5 ppm permet une croissance aussi forte que celle du témoin. Au contraire, les concentrations de 5 ppm et 25 ppm ont un log de différence avec le témoin. Une reprise de croissance est également observée après 24h de culture pour la concentration de 50 ppm, induisant une différence de 3 log avec le témoin après 30h de culture (Figure 25B). Aucun effet sur la croissance n'est observé avec la concentration de 2,5 ppm de Cd pour *L. thailandensis* DSM 22698, avec un très léger effet bactériostatique pour la concentration de 5 ppm (Figure 25C). En revanche, les concentrations de 25 ppm et 50 ppm ont un effet bactéricide sur cette souche. Après 24h de culture, une différence de, respectivement, 2 log et 3 log avec le témoin est observée. L'effet bactéricide est encore plus prononcé après 30h de culture où la concentration de 25 ppm de Cd induit une différence de 6 log avec le témoin. La concentration de 50 ppm a un effet tel que la quantité de bactérie se trouve en dessous du seuil de détection de 1 Log (UFC/mL) (Figure 25C).

Le cadmium a donc des effets très différents selon la souche et la concentration évaluées. Alors que *L. acidophilus* NCFM semble être la bactérie la moins affectée par la présence de Cd lors de l'évaluation en courbe de croissance (Figure 24), elle se révèle être l'une des souches les plus sensibles au test du Steers (Tableau 5). *L. rennini* DSM 20253 semble au contraire avoir une croissance inhibée par la présence d'au moins 25 ppm de Cd dans le milieu (Figure 24C), alors que le Cd a une CMI de 19 ppm pour cette dernière (Tableau 5) : même au-delà de la CMI, le Cd n'a qu'un effet bactériostatique sur des bactéries en croissance. *L. mesenteroides* DSM 20343 semble avoir un comportement similaire : les concentrations inférieures à la CMI (*i.e.* 19 ppm) n'ont aucun effet, alors que les concentrations supérieures à 25 ppm de Cd sont bactériostatiques pour la bactérie. *L. salivarius* Ls-33, et dans une

moindre mesure *L. rhamnosus* NCC3003 (GG), sont impactées par des concentrations en Cd inférieures à leurs CMI. En revanche, alors qu'elles possèdent la même CMI (< 55 ppm), elles ne se comportent pas du tout de la même façon en présence du métal (Figure 24B et Figure 25B). La seule souche pour laquelle un effet bactéricide est observé est *L. thailandensis* DSM 22698 (Figure 25C). Elle semble beaucoup plus sensible au métal : alors que la CMI du Cd est de 28,67 ppm (Tableau 5), la concentration de 5 ppm ralentit déjà fortement la croissance de la bactérie, au point qu'on observe une différence de 3 log après 30 heures de culture avec le témoin. La concentration de 25 ppm a également un léger effet bactéricide, alors que l'on se trouve en-dessous de la CMI. Ainsi, aucune généralité ne peut être tirée de ce travail, ce qui montre bien la complexité de la résistance aux métaux des bactéries. Il semble donc compliqué de se baser uniquement sur ce critère pour éliminer des bactéries du *screening* de chélation des métaux subséquent.

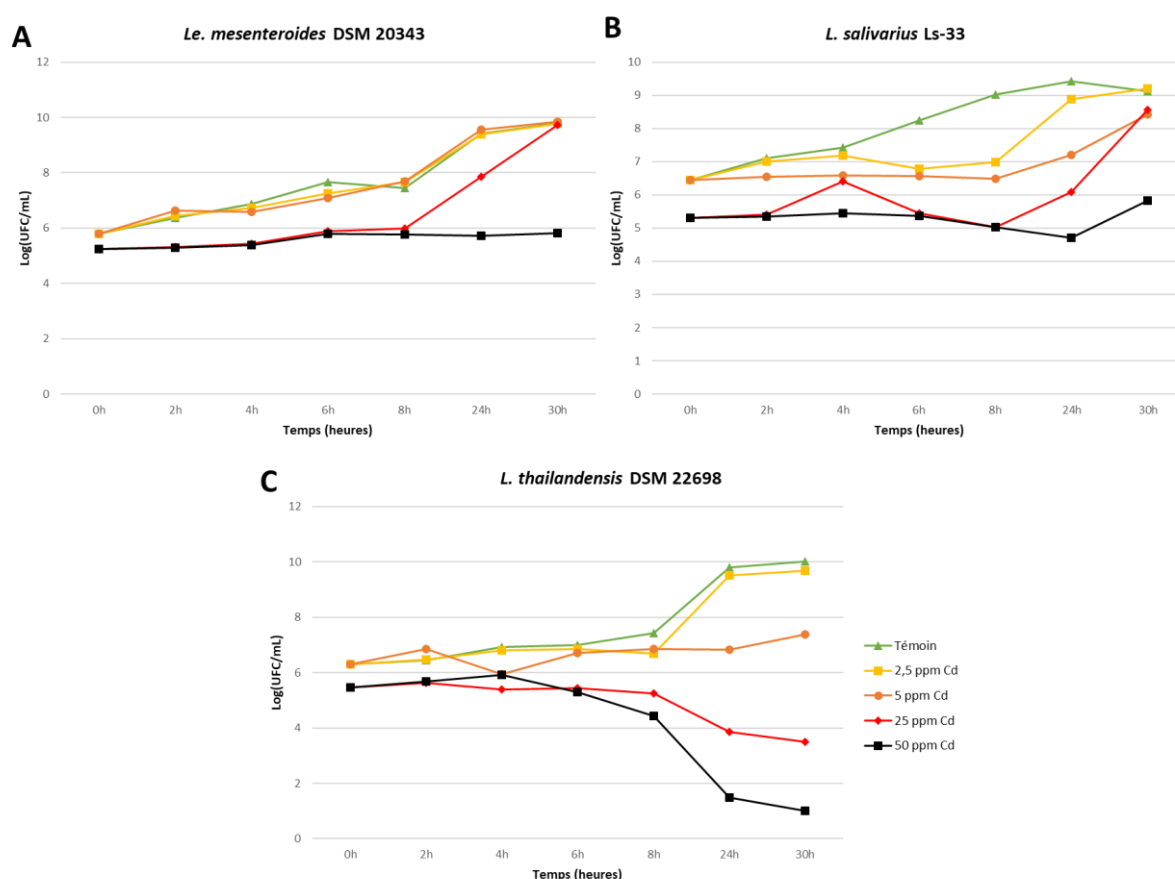


Figure 25 Effet du Cd sur la croissance de (A) *Le. mesenteroides* DSM 20343, (B) *L. salivarius* LS-33, et (C) *L. thailandensis* DSM 22698. Les concentrations de 2,5, 5, 25 et 50 ppm de Cd ont été testées.

II. Evaluation des capacités de captation des métaux

Même si la stratégie couramment employée dans la littérature est de se baser sur la résistance aux métaux pour trier les souches, et déterminer un hypothétique meilleur potentiel de chélation, nous avons décidé de prendre le contre-pied en étudiant plus de 200 souches bactériennes d'origines très diverses. En effet, la viabilité ne semble pas être un facteur essentiel et nous pensons que les propriétés de surface des bactéries n'ont pas forcément de liens avec les gènes de résistance aux métaux lourds, et les mécanismes associés multiples. Notre objectif est avant tout d'observer et d'étudier la diversité de chélation qui pourrait exister au sein d'une même espèce, entre des espèces différentes et même entre des phyla bactériens différents. Le soucier de cette étude est ainsi constitué de 99 BL, 11 bifidobactéries, 21 propionibactéries, 4 cutibactéries, ainsi que de 90 entérobactéries.

1. Capacités de chélation du Pb par les BL

Parmi les 99 bactéries lactiques évaluées dans cette étude, des capacités de chélation de 25 ppm de Pb(II) assez variables ont pu être observées (Figure 26). Même si plus des deux tiers des souches sont capable de capter entre 50 % et 90 % du métal, une grande diversité existe au sein même des bactéries du genre *Lactobacillus*. Celles-ci représentent 76 souches du portoir de l'étude, couvrant 65 espèces différentes. On observe ainsi des chélations allant de $6 \% \pm 2,5$ à $92 \% \pm 8,5$. Des résultats étonnants sont obtenus lorsque l'on regarde les chélations de plusieurs mêmes espèces. En effet, des différences marquées de chélation du Pb(II) peuvent être observées chez les *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei* et *L. rhamnosus* testées ici (Figure 27A). Au contraire, les deux *L. fermentum* que nous possédons dans le soucier montrent des chélations très bonnes toutes les deux, au contraire des deux *L. plantarum* qui sont de pauvres chélatrices de Pb(II) (Figure 27B). Ces variations prononcées de chélation intra-espèce se vérifient également chez les autres genres de BL *Carnobacterium*, *Weissella*, *Pediococcus*, ainsi qu'au sein des BL en général, comme on peut le voir en observant les résultats dans leur globalité (Figure 27 C). Ces différences ne sont pas dues aux différences de formes des bactéries (*i.e.* bacille vs. coque). Une grande diversité existe chez les bacilles, mais aussi chez les coques. Les trois entérocoques et les quatre pédiocoques testés ici montrent de bonnes capacités de chélation du Pb(II) (> 50 %) alors que *Lactococcus lactis* et quatre souches distinctes de *Staphylococcus aureus* sont de mauvais chélateurs (< 30 % pour la plupart) (Figure 27D).

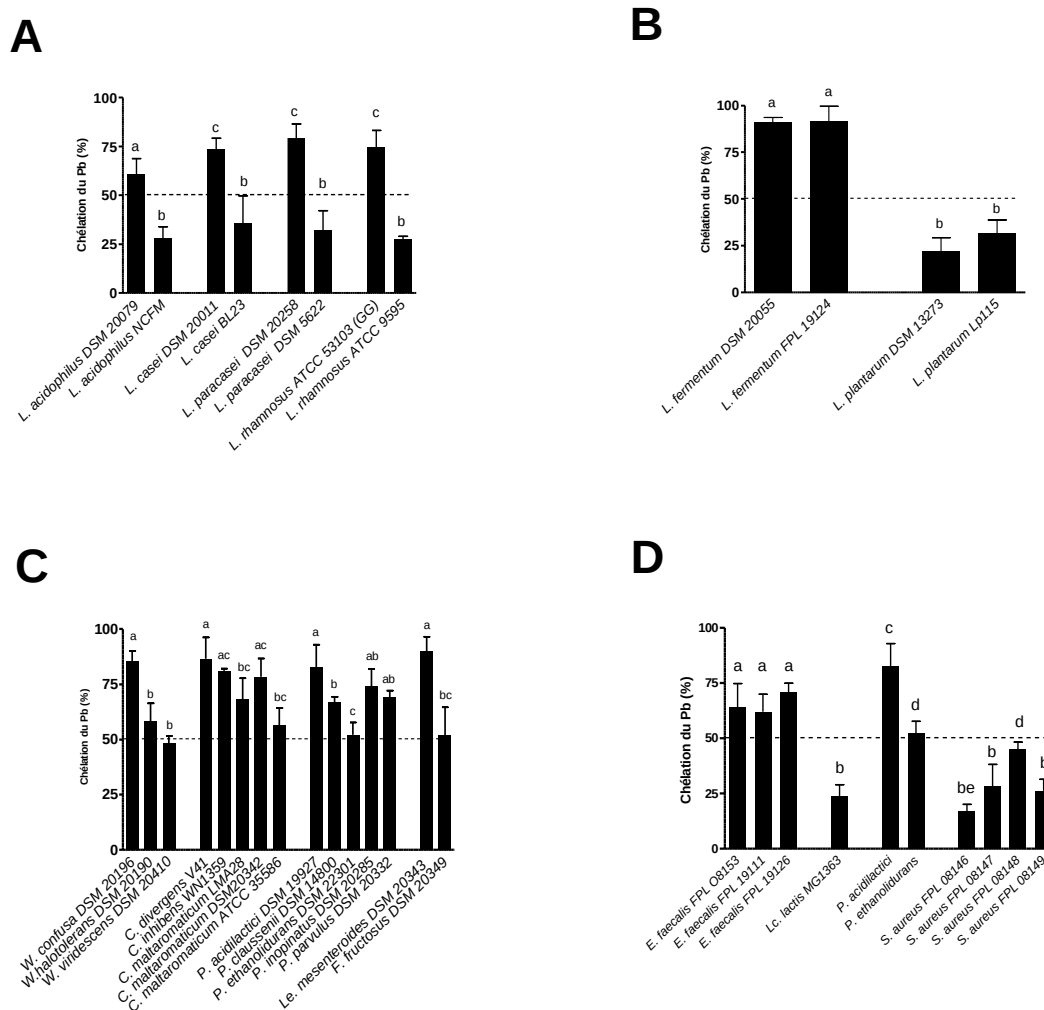


Figure 27 Capacités de fixation du Pb(II) par différentes souches. (A) Sélection de 5 paires de souches de même espèce mais présentant des capacités chélatrices différentes. (B) Deux paires de souches de même espèce avec des capacités similaires de chélation. (C) Quatre groupes de souches du même genre bactérien avec des capacités chélatrices différentes. (D) Quatre groupes de cocci avec des capacités de chélation différentes. Les capacités de chélation sont définies comme un pourcentage de la quantité initiale de métal en solution, réalisées en triplicats. Les différentes lettres indiquent des différences significatives ($p < 0,05$).

2. Des différences de chélation du Pb très marquées au sein des Actinobactéries

Au sein des Actinobacteria, les bifidobactéries montrent des capacités de chélation du Pb(II) très diverses, de 6,6 % à 90 % selon la souche observée (Figure 26). Ces différences marquées sont à nouveau visibles même au sein d'une même espèce. Par exemple certaines *Bifidobacterium longum* peuvent avoir des capacités de chélation qui varient d'un facteur 10 d'une souche à l'autre (*i.e.* 6,75 % $\pm$ 0,9 vs. 65,4 % $\pm$ 7,2 ; $p < 0,001$). Les souches du genre *Propionibacterium freudenreichii* sont toutes,

de base, de très mauvaises chélatrices de plomb (moyenne des chélation à $10,25 \% \pm 4,4$). Au contraire, les *Cutibacterium acnes* (autrefois nommées *Propionibacterium acnes*) possèdent des capacités de chélation comprises entre 41 et 56,8 %.

3. Les Entérobactérales ont des capacités de biosorption moyennes du Pb

Dans cette étude, 90 souches de bactéries appartenant à la classe des Gammaproteobacteria et à l'ordre des Enterobacterales ont été étudiées, dont 68 souches d'*E. coli* de la collection ECOR, agrémenté de 4 autres souches d'*E. coli* ayant des propriétés probiotiques (*E. coli* Nissle 1917), à caractéristiques de pathobiontes comme des souches adhérentes et invasives (LF82 et NRG857C) ou sans caractéristiques particulières (K12). D'autres genres bactériens commensaux ont également été ajoutés au soucier : cinq *Hafnia alvei* d'origine laitière ou intestinale, deux *Klebsiella* spp, deux *Enterobacter* spp., et cinq *Serratia marcescens* d'origine clinique. Dans l'ensemble, les Enterobacterales ont des capacités de chélation du Pb(II) moyennes et assez uniformes ($54,14 \% \pm 6,7$ en moyenne) (Figure 26). En effet, environ 90 % des souches de bacilles à Gram négatif ont un pouvoir chélateur compris entre 45 % et 65 %. Seulement deux *E. coli* et une seule *Hafnia alvei* dépassent ces capacités, atteignant plus de 75 % de chélation de 25 ppm de Pb en solution. Il est à noter que cette souche d'*Hafnia alvei* est la seule qui a été isolée d'un échantillon clinique, les 4 autres souches ayant une provenance alimentaire (Figure 28) ; on retrouve donc à nouveau cette différence de capacité de chélation intra-espèce, qui semble ici basée sur l'origine de la souche.

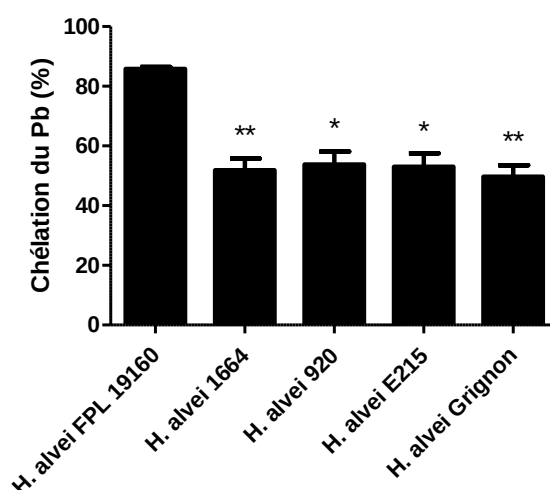


Figure 28 Evaluation des capacités de chélation du Pb par différentes souches d'*Hafnia alvei*. Les capacités de chélation sont définies comme un pourcentage de la quantité initiale de métal en solution, réalisées en triplicats. Les étoiles indiquent des différences significatives (t-test, $p < 0,05$ et $0,01$).

4. La capacité de chélation du Cd est phylum-, genre-, et souche-spécifique

Dans un premier temps, le *screening* de chélation du Cd(II) a été réalisé à la concentration de 25 ppm (Figure 29). La grande majorité du portoir de souches a été testé, et seulement 3 souches montraient des capacités de chélation comprises entre 10 % et 20 %. Afin d'essayer d'améliorer le *screening*, des expériences de chélation à 37°C, toujours à la concentration de 25 ppm de Cd, ont été réalisées sur un petit échantillon de souches (Figure 30A). Cette amélioration n'étant pas particulièrement significative, la température ambiante ($22\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$) est restée le paramètre choisi pour l'ensemble de la thèse.

Dans une même idée d'amélioration du *process*, les cultures bactériennes ont été arrêtées à différents temps : soit lorsque les bactéries sont en phase stationnaire (paramètre précédemment utilisé), ou lors de leur phase exponentielle (Figure 30B). La chélation semblant être un phénomène à la fois passif et actif, la phase exponentielle des bactéries pourrait leur permettre d'avoir un meilleur pouvoir chélateur en raison d'un métabolisme plus actif. Malheureusement, aucun changement significatif n'a été observé. L'ancien paramètre de la phase stationnaire est donc conservé pour le reste des expériences.

Des temps de contacts différents ont aussi été réalisés (Figure 30 C-E). Le temps allongé est le moment où le Cd(II) est ajouté aux bactéries calibrées à la DO 2,5. Celui normalement utilisé pour toutes les expériences est d'une heure. Ainsi, ce temps a été rallongé à 2h, 3h et environ 15h. Malgré une hausse des chélations pour certaines souches après 2h de contact, on atteint tout au plus 4 % de chélation. On voit que, à nouveau, même après 3h de contact, les chélations sont certes augmentées mais de façon non significative. La chélation est fortement augmentée uniquement après 15h de contact environ (Figure 30 D et E). Un effet proportionnel du temps de contact sur la chélation est visible pour *L. floricola* DSM 23037 (Figure 30E). Se pose alors la question de la légitimité physiologique d'un temps aussi long. Ainsi, par souci de représentation de ce qui se passe dans l'intestin, et de pratique, le temps de contact d'une heure a été conservé.

Le dernier paramètre potentiellement modifiable est la quantité de Cd(II). En effet, même si la quantité de 25 ppm de Pb(II) est représentative des concentrations auxquelles les humains sont exposés par la voie digestive, cela est moins vrai pour le Cd(II). Afin d'améliorer le *screening* et de se rapprocher de conditions plus physiologiques, la concentration en Cd(II) a été baissée à 1 ppm (Figure 31). Ce paramètre s'avère cette fois beaucoup plus discriminant. Parmi les 95 BL, 90 % chélatent moins de 20 % du Cd. En revanche, quelques souches s'avèrent intéressantes. Trois *Pediococcus* spp, une souche de *Carnobacterium divergens*, ainsi qu'une souche de *L. rhamnosus* et *Leuconostoc mesenteroides* montrent des capacités de chélation supérieures à 25 %, allant même jusqu'à $50\% \pm 15,7$ pour la

souche de *Pediococcus acidilactici* DSM 19927. Parmi les Actinobacteria, les bifides possèdent des capacités de chélation variables, qui semblent être dépendantes de la souche plutôt que de l'espèce considérée. En effet, les capacités des souches de *Bifidobacterium breve* varient de $6,2 \% \pm 0,6$ à $40,7 \% \pm 6,7$ ($p < 0,01$), et pour les souches de *B. longum*, elles varient de $3,6 \% \pm 1,7$ à $18,9 \% \pm 5,8$ ($p < 0,01$). Exceptée une, toutes les souches de *P. freudenreichii* sont de très mauvaises chélatrices de Cd, alors que les *C. acnes* sont de faibles ou moyennes chélatrices. Enfin, la plupart des 60 Entérobactérales testées sont de faibles ou très faibles chélatrices, exceptées 4 souches qui chélatent entre 21 % et 30 % de 1 ppm de Cd (ECOR 63, ECOR 66, *E. coli* LF82 et *E. coli* Nissle, chélatent respectivement $24,2 \% \pm 3,6$, $21,2 \% \pm 5,6$, $20,5 \% \pm 2,2$ et $25,2 \% \pm 3,5$).

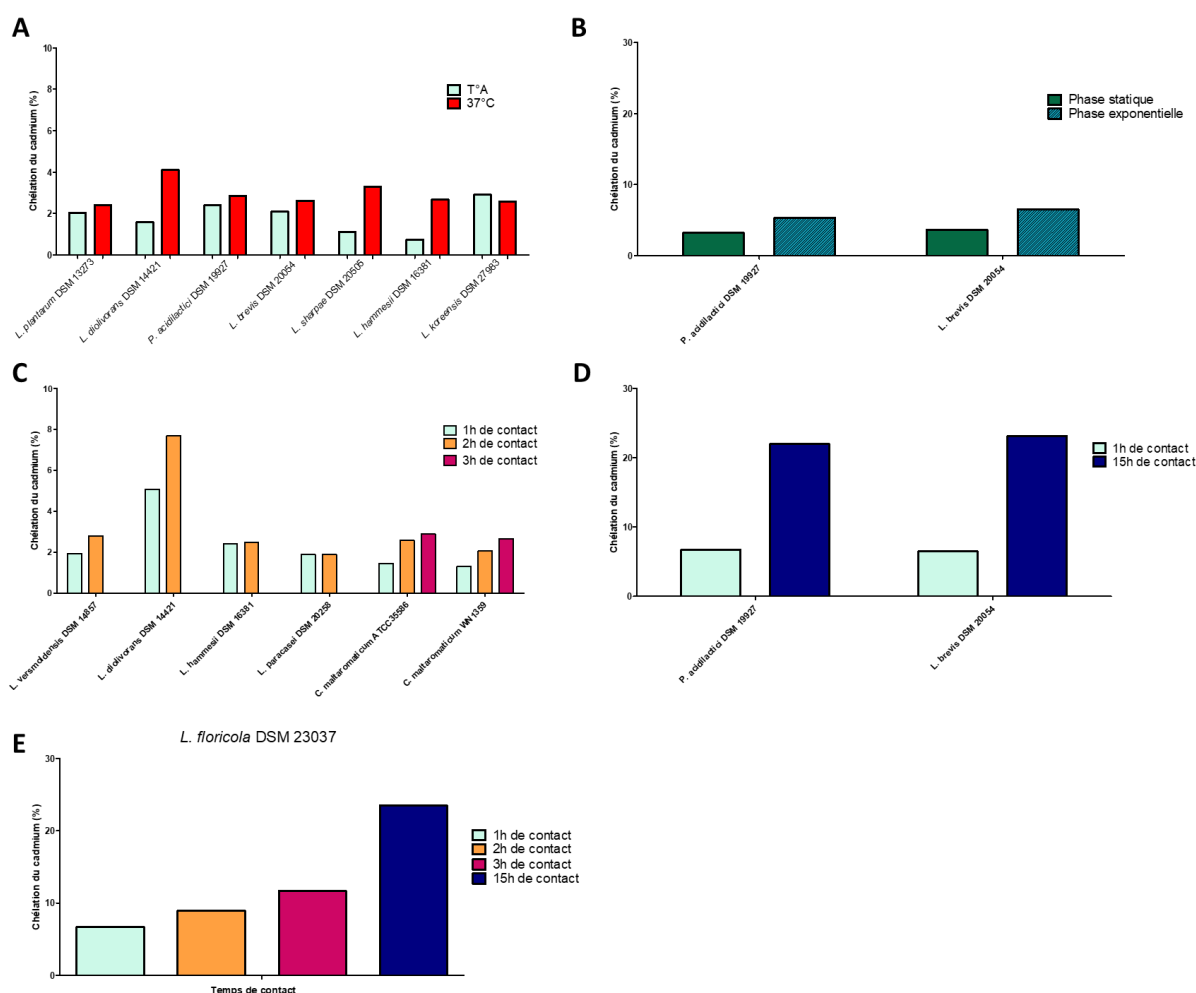


Figure 30 Impact de la variation de différents paramètres sur la chélation de 25 ppm de Cd (A) Effet de la température. (B) Effet de la phase de croissance des bactéries. (C) à (E) Effet du temps de contact. Les capacités de chélation sont définies comme un pourcentage de la quantité initiale de métal en solution.

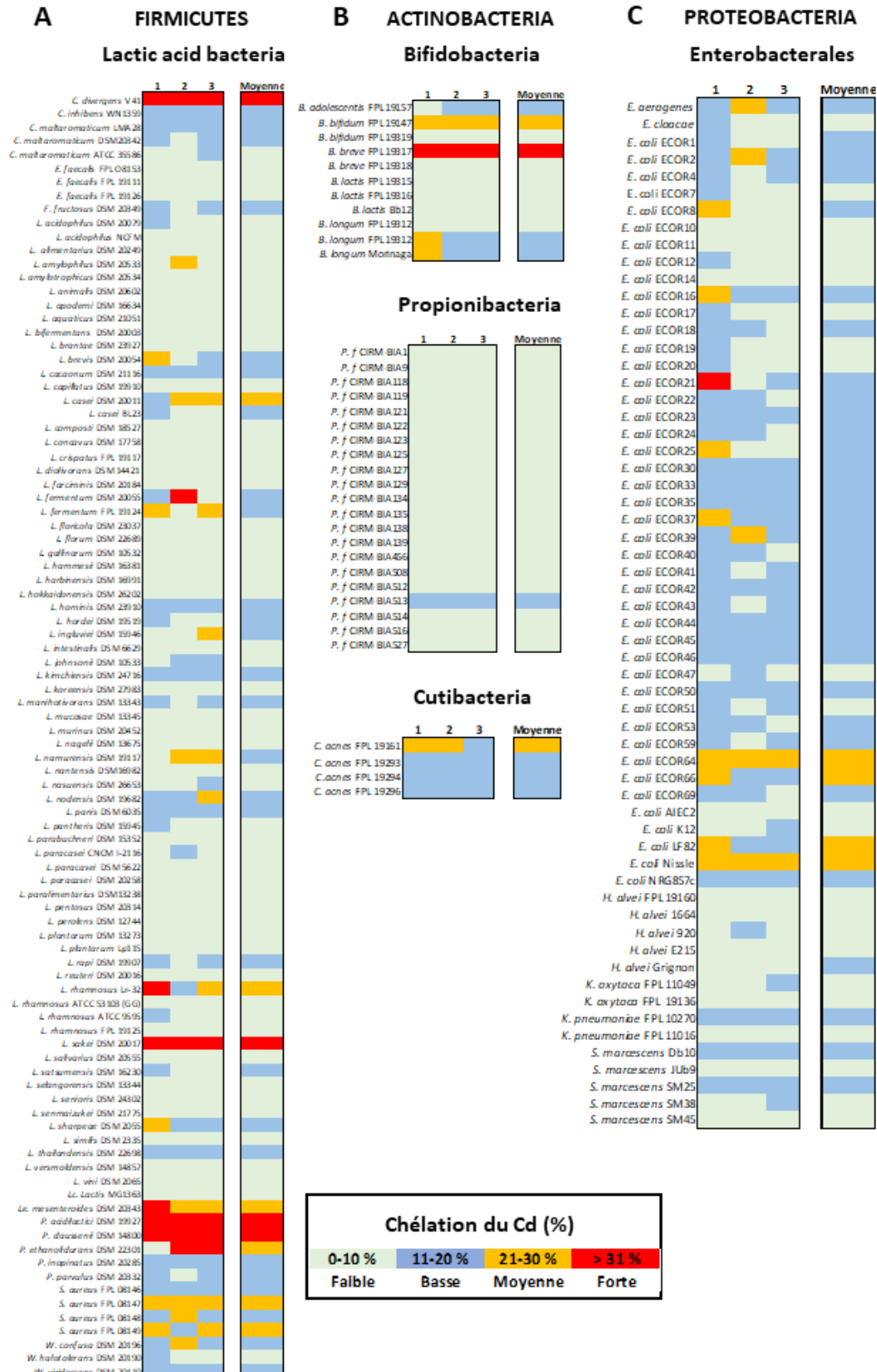


Figure 31 Evaluation de la capacité de chélation de 1 ppm de Cd par (A) des Firmicutes, (B) des Actinobactéries, et (C) des Entérobactérales. Les capacités de chélation sont définies comme un pourcentage de la quantité initiale de métal en solution, réalisées en triplicats. Ces capacités sont qualifiées de faible (0-10 %), basse (11-20 %), moyenne (21-30 %) et forte (> 30 %).

5. Les capacités de chélation de l'Al sont aussi genre- et souche-spécifique

La capacité des bactéries à chélater l'Al(III) d'une solution d'AlCl₃ est très dépendante de la souche considérée. Les chélation des BL varient de 5 à 28 % de chélation, avec une moyenne de 14,8 % $\pm$ 4,7 (Figure 32). Les bifidobactéries et les propionibactéries chélatent également peu l'aluminium (moyennes à 8,9 $\pm$ 2,8 et 9,4 % $\pm$ 2,6 respectivement), les valeurs n'excédant que très rarement 10 % de chélation. Les souches de *C. acnes* sont en revanche plus efficaces, et montrent des capacités de chélation plutôt modérées avec une moyenne de 24,3 % $\pm$ 4,7 (Figure 32). Au contraire, pour l'aluminium, les souches d'Entérobactérales ont des capacités de chélation plutôt bonnes, allant de 12 % à 30 % avec une moyenne de 20,4 % $\pm$ 4,7 (Figure 32). Quatre souches d'*E. coli* montrent des chélation comprises entre 25 % et 30 % (ECOR37, ECOR40, ECOR50, ECOR64). En revanche, les souches de *Serratia* et d'*Hafnia* semblent moins chélatrices, avec une moyenne d'environ 15 %.

Ces faibles chélation apparentes pourraient être dues au fait que la liaison entre l'Al et les bactéries n'est pas aussi robuste que celles du Pb et du Cd. En effet, des dosages effectués pour les trois métaux montrent que très peu de Pb et de Cd sont retrouvés dans les surnageants de lavages, contrairement à l'Al (Figure 33). Pour le Pb et le Cd, la majorité du métal qui n'est pas fixé par les bactéries (culot) se retrouve dans le premier surnageant, qui correspond au liquide de contact avec les cellules. En revanche, pour l'Al, des quantités non-négligeables sont retrouvées dans le surnageant de premier lavage, et encore plus dans celui du second lavage (Figure 33). Les bactéries semblent donc désorber l'Al au fur et à mesure des lavages, laissant penser que la liaison est labile.

6. Les capacités de chélation des métaux peuvent être modulées en présence des autres ETM

Etant donné que le Pb et le Cd sont fréquemment présents conjointement dans l'alimentation, l'eau et de façon plus générale dans l'environnement, ils induisent des co-expositions. L'aluminium étant omniprésent, une exposition au Pb et/ou au Cd est forcément accompagnée d'une exposition à l'Al. Les chélation de 41 BL et de 27 Entérobactérales ont donc été envisagées en présence de mélange de 2 métaux. Lorsque le Pb et le Cd sont associés (*i.e.* 25 ppm de Pb et 1 ppm de Cd), la chélation du Pb est inchangée pour la plupart des souches testées ici (Figure 34). Elle est significativement diminuée pour 6 BL (Figure 34 A et B), et 7 Entérobactérales (Figure 34 C). Elle est au contraire augmentée pour 6 BL (Figure 34 A et B). A l'inverse, la chélation du Cd est altérée pour seulement 4 BL et pour la majorité des Entérobactérales (17 souches) (Figure 35). Lorsque l'on considère les BL, la chélation du Cd est amplifiée en présence de Pb pour 5 souches (Figure 35 A et B) ; tandis qu'aucune Entérobactérale ne



Figure 32 Evaluation de la capacité de chélation de 25 ppm d'Al par (A) des Firmicutes, (B) des Actinobactéries, et (C) des Entérobactérales. Les capacités de chélation sont définies comme un pourcentage de la quantité initiale de métal en solution, réalisées en triplicats. Ces capacités sont qualifiées de faible (0-10 %), basse (11-20 %), moyenne (21-30 %) et forte (> 30 %).

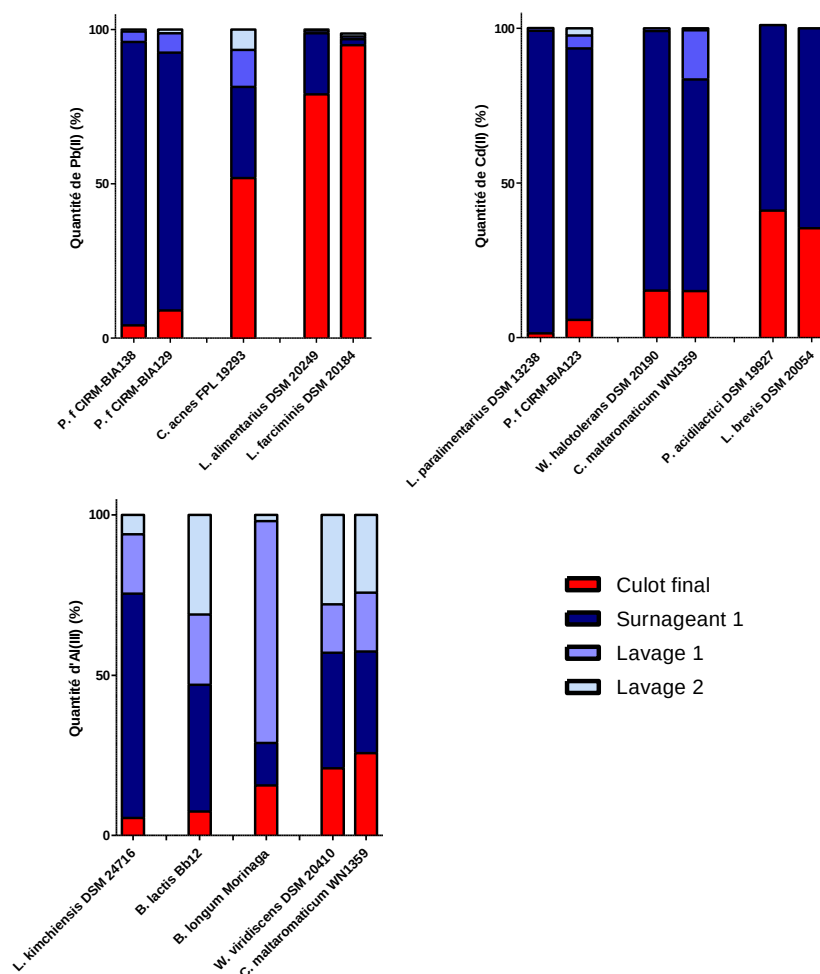


Figure 33 Résultats de dosages de Pb (A), de Cd (B) et d'Al (C) dans le culot final, le surnageant de contact puis dans les deux résidus de lavages successifs pour quelques souches données.

montre de meilleure chélation du Cd en présence de Pb (Figure 35 C). En revanche, que ce soit la chélation du Pb comme celle du Cd, ces dernières sont fortement affectées par la présence de 25 ppm d'Al (Figure 34 et 35). La chélation du Pb s'effondre de façon significative en présence de l'Al pour toutes les souches testées (Figure 34). Une tendance similaire est observée pour la chélation du Cd chez les Entérobactérales : toutes les *E. coli* voient leur capacité chélatrice du Cd fortement diminuée en présence d'Al, alors que les souches d'*Enterobacter aerogenes* et *Klebsiella pneumoniae* gardent des chélations similaires (Figure 35 C). En revanche, la chélation du Cd en présence d'Al semble aussi fortement diminuée pour les BL, mais de façon significative uniquement pour 18 souches. En retour, la chélation de l'Al ne semble pas être beaucoup impactée par la présence de Pb (Figure 36) : cette chélation est significativement diminuée pour 2 BL et aucune Entérobactérales ; elle est augmentée pour une seule BL (*S. aureus* FPL 08147). De façon similaire, la chélation de l'Al en présence de Cd est augmentée pour une seule souche d'Entérobactérale (*E. coli* NRG857C) (Figure 36C). Elle est diminuée de façon significative pour 7 souches de BL (Figure 36C).

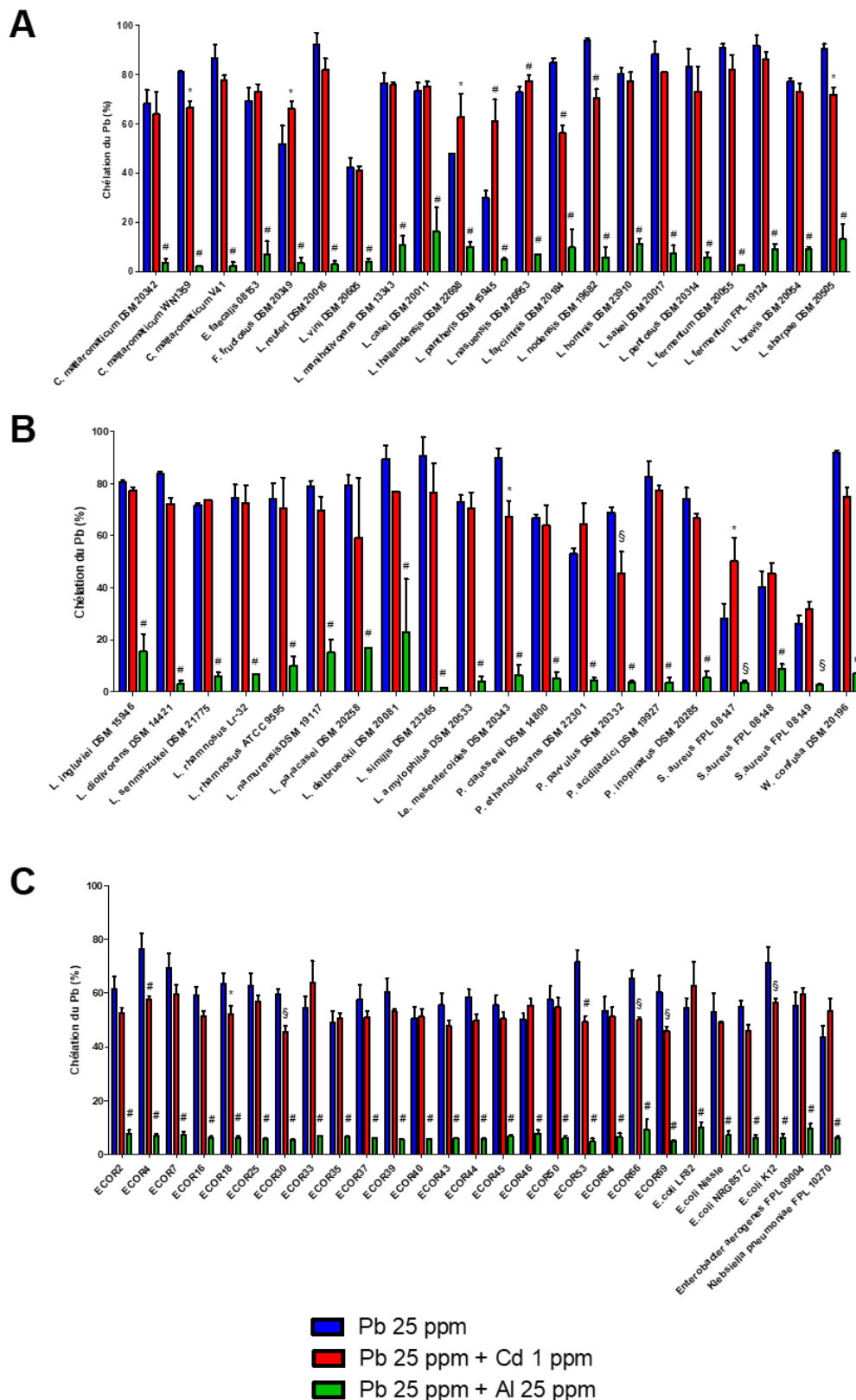


Figure 34 Effet de mélanges de métaux sur la chélation de 25 ppm de Pb sur des souches de LAB (A et B) et d'Entérobactérales (C). Le Pb ajouté aux bactéries seul, mélangé à 1 ppm de Cd, ou 25 ppm d'Al. Les capacités de chélation sont définies comme un pourcentage de la quantité initiale de métal en solution, réalisées en triplicats. L'analyse statistique a été réalisée avec le test 2-way ANOVA : * $p < 0,05$; § $p < 0,01$; # $p < 0,001$.

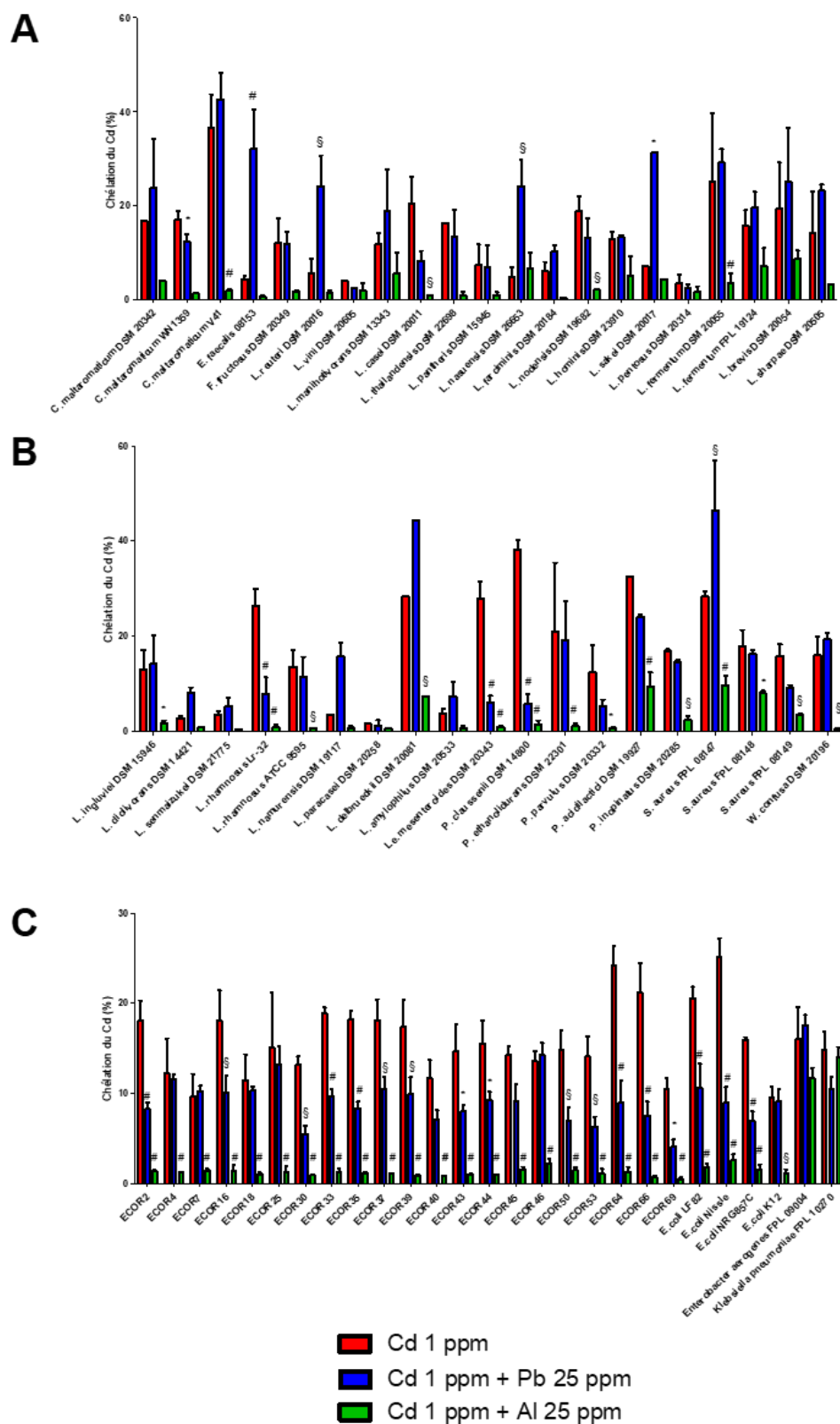


Figure 35 Effet de mélanges de métaux sur la chélation de 1 ppm de Cd sur des souches de LAB (A et B) et d'Entérobactéries (C). Le Cd ajouté aux bactéries seul, mélangé à 25 ppm de Pb, ou 25 ppm d'Al. Les capacités de chélation sont définies comme un pourcentage de la quantité initiale de métal en solution, réalisées en triplicats. L'analyse statistique a été réalisée avec le test 2-way ANOVA : * $p < 0,05$; § $p < 0,01$; # $p < 0,001$.

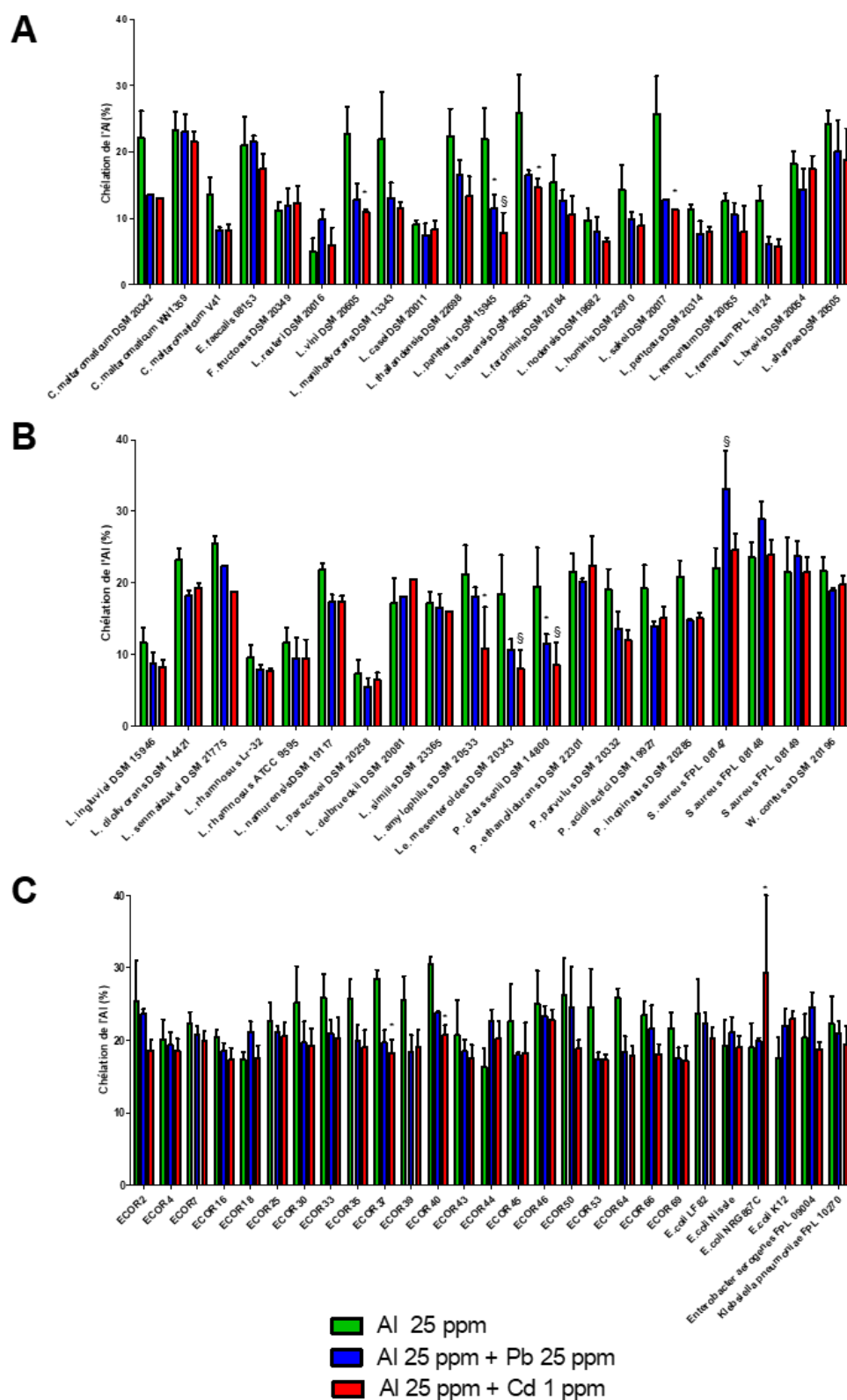


Figure 36 Effet de mélanges de métaux sur la chélation de 25 ppm d'Al sur des souches de LAB (A et B) et d'Entérobactérales (C). L'Al ajouté aux bactéries seul, mélangé à 25 ppm de Pb, ou 1 ppm de Cd. Les capacités de chélation sont définies comme un pourcentage de la quantité initiale de métal en solution, réalisées en triplicats si possible. L'analyse statistique a été réalisée avec le test 2-way ANOVA : * $p < 0,05$; § $p < 0,01$; # $p < 0,001$.

Conclusion

Dans la première partie de ce travail, nous avons évalué la capacité chélatrice de plus de 200 souches bactériennes vis-à-vis du plomb, du cadmium et de l'aluminium. Des premières expériences définissant les CMI des métaux sur une partie de la bibliothèque nous permettent de montrer que malgré des CMI très différentes, toutes les souches résistent à la toxicité des métaux aux concentrations utilisées pour les expériences de chélation (*i.e.* 25 ppm de Pb et 1 ppm de Cd). Même si ces dernières sont résistantes aux métaux, ils peuvent avoir des effets différents sur la croissance. Des effets assez similaires sur la croissance de *L. plantarum* et *L. buchneri*, ou encore *Bacillus xiamenensis*, sont décrits dans la littérature, avec des méthodes un peu différentes de celles que nous avons utilisées (Kirillova *et al.*, 2017 ; Mohapatra *et al.*, 2019). Ces effets, la plupart du temps bactériostatiques, n'ont aucun impact dans nos expériences de chélation car la densité bactérienne est calibrée à DO_{600nm} 2,5 et ne change pas au cours du temps. Les bactéries sont en effet mises en suspension dans du Ringer, milieu osmotique nous permettant simplement de les maintenir intactes mais sans permettre leur prolifération. Ces CMI ne sont d'ailleurs absolument pas corrélées aux chélations subséquentes (Tableau 6). Pour des mêmes CMI, les chélations des souches peuvent être très différentes, que ce soit pour le Cd comme pour le Pb. Si on prend l'exemple de la CMI de 34,5 ppm, les chélations des souches varient de 1,5 % à 23,6 %, qui est l'une des meilleures chélations obtenues pour ce métal. Ces résultats sont similaires à d'autres observations décrites dans la littérature sur différentes souches de *L. plantarum* (Muhammad *et al.*, 2018), et démontrent que la stratégie de pré-sélection de souches sur la base de leur résistance au métal n'est pas forcément adaptée. De plus, il a déjà été prouvé que le fait que les bactéries soient vivantes ou mortes n'a pas de réelle importance pour la chélation des métaux. Utilisant le modèle de Langmuir qui permet de définir l'absorption d'un substrat donné par une surface (ici respectivement les métaux et les bactéries), Ibrahim *et al.* (2006) montrent que des souches de *L. rhamnosus* et de *P. freudenreichii* ont des Q_{max} presque identiques qu'elles soient vivantes ou mortes (par chauffage). D'autres études ont également réalisé ce type d'expériences et arrivent aux mêmes conclusions (Haltunnen *et al.*, 2008a ; Topcu et Bulat, 2010 ; Mohapatra *et al.*, 2019 ; Zhai *et al.*, 2020). Malgré tout, Mohapatra *et al.* (2019) ont montré que l'absorption par les cellules vivantes est légèrement meilleure que lorsqu'elles sont mortes, cela faisant intervenir à la fois les mécanismes passifs d'adsorption à la membrane, et plus actifs d'internalisation du métal (Huang *et al.*, 2018). Jusqu'à maintenant, aucune étude n'a permis de mettre en évidence un composant déterminant des bactéries dans les mécanismes de bioremédiation (Lin *et al.*, 2019b). Les voies utilisées sont tellement diverses, et font intervenir tellement d'éléments différents qu'il paraît compliqué d'en dégager un comme facteur clé. Kirillova *et al.* (2017) montrent d'ailleurs que la charge nette de la paroi des bactéries peut

Tableau 6 Sélection de 13 souches associées à leur chélation moyenne de 1 ppm de Cd et à leur CMI moyenne. Les capacités de chélation sont définies comme un pourcentage de la quantité initiale de métal en solution, réalisées en triplicats. Les CMI moyennes sont déterminées par une moyenne de 3 expériences par la méthode du Steers.

Souche	Chélation moyenne du Cd (%)	CMI moyenne du Cd (ppm)
<i>L. mucosae</i> DSM13345	5,86%	11 ppm
<i>L. ingluviei</i> DSM15946	13,08%	11 ppm
<i>P. inopinatus</i> DSM20285	16,75%	11 ppm
<i>L. hordei</i> DSM19519	10,63%	29 ppm
<i>L. senmaizukei</i> DSM21775	3,54%	29 ppm
<i>L. casei</i> DSM20011	23,59%	34,5 ppm
<i>L. paralimentarius</i> DSM13238	1,57%	34,5 ppm
<i>L. satsumensis</i> DSM16230	11,39%	34,5 ppm
<i>L. gallinarum</i> DSM10532	5,66%	> 55 ppm
<i>W. confusa</i> DSM20196	15,81%	> 55 ppm
<i>L. hominis</i> DSM23910	13,83%	> 55 ppm
<i>L. acidophilus</i> DSM20079	8,06%	> 55 ppm
<i>L. fructosus</i> DSM20349	11,78%	> 55 ppm

largement varier d'une souche à l'autre, et n'est pas forcément corrélée au potentiel de chélation de ces souches.

Cette complexité nous empêche de définir clairement une hypothèse quant à un critère de sélection de souches potentiellement fortement chélatrices. Nous avons donc choisi de ne pas faire de compromis, et de tester la chélation de bactéries vivantes de différents genre bactériens afin d'analyser la diversité qui existe au sein des espèces et des souches. Nous avons donc utilisé des souches non-pathogènes d'origine intestinale ou alimentaire. La plupart de ces souches sont considérés comme sans danger, et possèdent le statut GRAS (« *Generally Recognized as Safe* ») délivré par la FDA (« *Food and Drug Administration* »). Ce statut, et le caractère inoffensif en général, est un élément essentiel dans la sélection des souches pour des applications futures *in vivo*. Contrairement à la plupart des études sur la bioremédiation par des bactéries qui utilisent du métal en solution dans de l'eau déminéralisée, nous avons choisi de travailler avec une solution de Ringer pour les expériences de chélation et les lavages, ce qui permet de maintenir une certaine osmolarité.

Nos résultats confirment et étendent les observations qui ont déjà pu être faites quant à la grande diversité fonctionnelle des Gram positif et Gram négatif. Les mécanismes de captation des métaux sont en fait souche-spécifiques, et déjà décrits pour certains dans la littérature (Kumar *et al.*, 2018 ; Diep *et al.*, 2018 ; Lin *et al.*, 2019b). On peut ainsi distinguer deux grands principes : la biosorption et la bioaccumulation. La biosorption est un mécanisme passif, qui consiste en la fixation du métal sur la paroi bactérienne, par le biais d'échange d'ion, de précipitation ou encore de chélation. Alors que la bioaccumulation est un mécanisme qui fait généralement suite à la biosorption, et qui consiste en

l'internalisation des ions métalliques dans le cytoplasme, liés à des protéines ou stockés pour les rendre moins réactifs et donc moins toxiques. Il est communément admis que les groupements hydroxyl (du peptidoglycane principalement), carboxyl, phosphate (des protéines de surface) ainsi que les protéines de la capsule sont des facteurs clé dans les mécanismes de biosorption. Ils sont fortement influencés par le pH du milieu, et leur spécificité et leur abondance a un effet important sur la captation des ions métalliques (Lin *et al.*, 2019a et b). Même si ces mécanismes sont complexes, et parfois indépendants des gènes que portent et expriment les bactéries individuellement (*i.e.* les conditions de culture, le milieu, la phase de croissance, concentration initiale en métal *etc...*), il pourrait être intéressant de réaliser une étude de génomique comparative chez les BL sur la base de nos résultats, pour tenter d'identifier des gènes qui seraient *up*- ou *down*-régulés.

Globalement, nos résultats montrent que les BL et les *Bifidobacterium* sont de bonnes chélatrices de Pb, alors que les propionibactéries laitières, dans l'état, ont de faibles capacités de captation. Les bactéries Gram-négatives ont des capacités moyennes dans la majorité. Nous avons donc identifié de très bons candidats pour la chélation du Pb, dont certaines espèces comme *L. sakei*, *L. fermentum*, *B. bifidum*, on encore *Weissella* spp. sont déjà décrites dans d'autres articles comme donnant de bons résultats (Halttunen *et al.*, 2007 ; Teemu *et al.*, 2008 ; Bhakta *et al.*, 2012 ; Ojekunle *et al.*, 2017). En revanche, il semblerait que nous soyons les premiers à décrire les *Carnobacterium* spp. comme étant très chélatrices de Pb.

Quant à la captation du Cd, malgré de nombreuses tentatives d'amélioration des conditions de captation, seulement 5 souches sur les 220 testées montrent de bons résultats (*B. breve*, *L. sakei*, *Carnobacterium divergens*, et deux souches de *Pediococcus*), suggérant que les BL ne sont pas particulièrement indiquée dans la lutte contre la toxicité du Cd. Les quelques souches de *L. rhamnosus* et *L. plantarum* testées ici sont des faibles chélatrices du Pb et du Cd, contrairement à ce qui est retrouvé par Daisley *et al.* (2019) et Zhai *et al.* (2014). Cela montre bien à nouveau qu'aucune extrapolation ne peut être faite sur la base des résultats pour une souche bactérienne donnée à l'espèce, et encore moins au genre bactérien. Il est à noter que les 21 souches de *Propionibacterium* ont des capacités de captation du Pb et du Cd très similaires, alors qu'elles possèdent des protéines de surface ainsi que des profils d'expression d'exopolysaccharides très différents et souche-spécifiques (Foligné *et al.*, 2013).

Très peu d'études se sont intéressées jusqu'à lors aux capacités de captation de l'aluminium par les bactéries. Yu *et al.* (2016) montrent que des souches de BL dont des *L. plantarum*, *L. casei*, ou encore d'autres souches retrouvées dans notre bibliothèque, ont des capacités de chélation de l'Al supérieures à 20 %, ce qui est légèrement supérieur à ce que nous retrouvons. Il est quand même à

noter que les auteurs ont utilisé une concentration en Al de 5 ppm, contre 25 ppm dans notre cas. On peut imaginer que les chélation de nos souches seraient meilleures dans les mêmes conditions, et pourraient atteindre des valeurs similaires. Il est intéressant de noter également que dans notre étude, les Entérobactérales ainsi que les *Actinobacteria* montrent de meilleures capacités de chélation de l'Al que les BL.

Nos expériences de mélange de métaux montrent que dans l'ensemble, les chélation du Pb et du Cd ne sont pas affectées par la présence de l'autre métal, voir même augmentées dans certains cas. Ce constat est encourageant quant à l'utilisation de ces souches pour la chélation du Pb et/ou du Cd *in vivo*, car on les retrouve souvent associés. Il serait intéressant de sélectionner une ou plusieurs souches bactériennes montrant de bons résultats *in vitro* et de la confronter à des mélanges de métaux *in vivo*, pour voir si cette propriété est conservée dans l'organisme. Il reste également à voir si des mélanges de souches pourraient avoir un effet synergique quant à la chélation du Pb et du Cd, en sélectionnant les plus performantes pour chaque métal par exemple. Ce qui pourrait être intéressant dans le cadre de mélanges avec l'aluminium, dont la présence semble gêner la chélation des deux autres métaux. Djurasevic *et al.* (2016) ont déjà montré que l'administration d'un probiotique contenant plusieurs souches chélatrices de Cd dans la nourriture de rats permet une diminution de la concentration en Cd dans le sang, et une augmentation de son excrétion dans les fèces. Cela prouve également que des souches qui montrent de bonnes capacités de captation des métaux *in vitro* peuvent fonctionner *in vivo*, à la fois chez la souris pour des empoisonnements aigus et chroniques (Tian *et al.*, 2012 ; Zhai *et al.*, 2013 ; Zhai *et al.*, 2014 ; Li *et al.*, 2017 ; Yu *et al.*, 2017 ; Zhai *et al.*, 2019), chez le rat (Djurasevic *et al.*, 2016) mais aussi chez l'humain (Bisanz *et al.*, 2014). Le *screening* réalisé ici sert donc de base pour sélectionner des souches intéressantes pour des études *in vivo*, qui permettront de prendre en compte toute la physiologie intestinale, ainsi que la présence des autres éléments-traces métalliques, ions essentiels et autres molécules. Il a déjà été démontré que la présence d'ETM modifie la diversité et donc la fonction du microbiote (Breton *et al.*, 2013 ; Assefa et Köhler, 2020), et que les prébiotiques peuvent interférer avec l'équilibre des métaux (Zhai *et al.*, 2019). Dans tous les cas, nous avons pu identifier des souches chélatrices qui peuvent être testées *in vivo* en modèle animal.

Chapitre 2 : Evaluation des capacités de chélation *in vivo* de souches prometteuses sélectionnées *in vitro*

Caenorhabditis elegans : un modèle de laboratoire d'intérêt

Présentation : *Caenorhabditis elegans* est un nématode microscopique, dont la longueur maximale est de 1mm (Figure 37). Il est bactérivore, et vit normalement sur le sol, plus particulièrement dans des habitats riches en bactéries, comme les fruits/plantes en décomposition (Félix et Braendle, 2010 ; Schulenburg et Félix, 2017). Il est retrouvé sur tous les continents, et ne semble pas avoir d'environnement de vie préférentiel, à l'exception peut-être des milieux chauds et humides où la décomposition des végétaux est plus prononcée (Schulenburg et Félix, 2017). Contrairement à certains autres nématodes, il n'est pas parasitaire et donc totalement inoffensif.

Physiologie : Son anatomie est très similaire à ce qui est retrouvé chez certains organismes supérieurs. On retrouve 300 cellules neuronales, ainsi qu'un système digestif très ressemblant à celui de l'homme. En effet, ce dernier est composé de 20 cellules intestinales polarisées, comportant des microvillosités dans la lumière intestinale formant une bordure en brosse comme les entérocytes humains (Figure 38). De plus, de nombreux mécanismes et voies de signalisations sont retrouvées identiques ou très similaires (Leung *et al.*, 2008). *C. elegans* est un organisme simple, composé précisément de 959 cellules à l'âge adulte pour les sujets hermaphrodites, et de 1031 chez les mâles.

Cycle de vie : La plupart des individus sont hermaphrodites, et peuvent s'auto-reproduire. Dans la nature, seuls 0,1 % des vers sont des mâles (WormAtlas, <https://www.wormatlas.org>). Le cycle de vie de *C. elegans* est très bien décrit, et les effets des variations de température sur ce cycle très bien connus (Figure 39). Le cycle de vie du ver est constitué d'un stade embryonnaire qui dure environ 9h à 22°C. Les œufs éclosent pour donner lieu au premier stade larvaire L1. S'il y a de la nourriture en quantité suffisante pour toute la population des vers, les L1 continuent leur développement vers le stade L2. En cas d'absence totale de nourriture, les larves L1 s'arrêtent de grandir. Au stade L2, si un manque de nourriture se fait sentir ou s'il y a un choc thermique, les larves peuvent entrer dans le stade dit « Dauer » qui est une forme de résistance du ver. Les larves « Dauer » peuvent survivre ainsi pendant des mois, et reprendre le cours du cycle si l'origine du stress est stoppée. Dans le cas normal, les larves L2 poursuivent leur développement pour donner des larves L3 puis L4. Les larves L4 deviennent alors des jeunes adultes qui se développent et deviennent adultes, unique stade où la production des œufs est réalisée. Les vers adultes vivent ainsi environ 3 semaines à 20°C.

Utilisation en laboratoire : Les connaissances scientifiques disponibles sur ce ver sont considérables et font de lui un modèle animal très bien caractérisé (Riddle, 1997). Son génome a été le premier entièrement séquencé en 1998 (*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998), ce qui, en plus de sa simplicité, a contribué à en faire un modèle incontournable des laboratoires de génétique, et plus

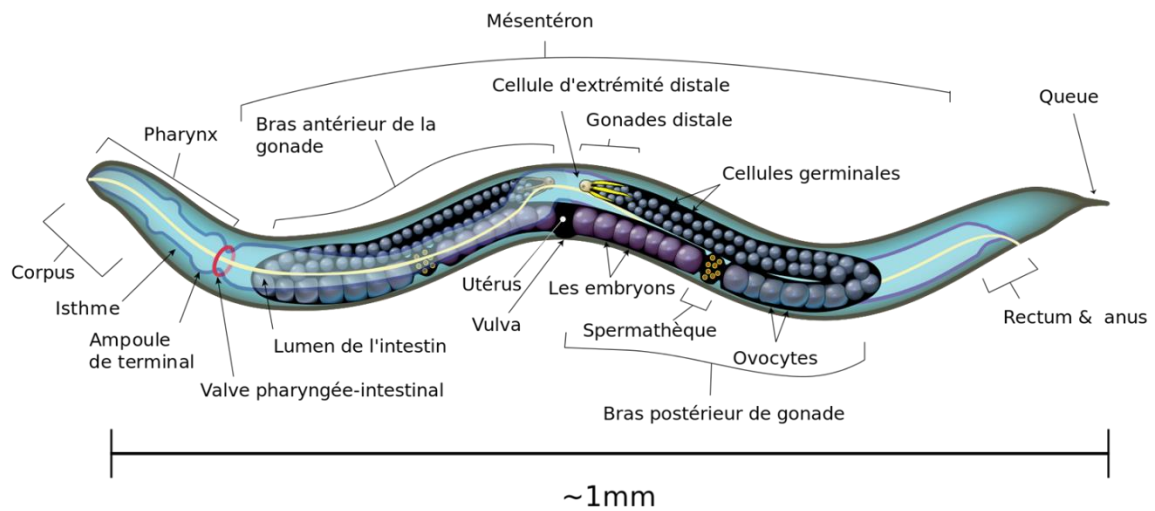


Figure 37 Schéma du ver *Caenorhabditis elegans*. Image obtenue sur le site de Wikimedia Commons : https://commons.wikimedia.org/wiki/File:C_elegans-anatomie-fr.svg

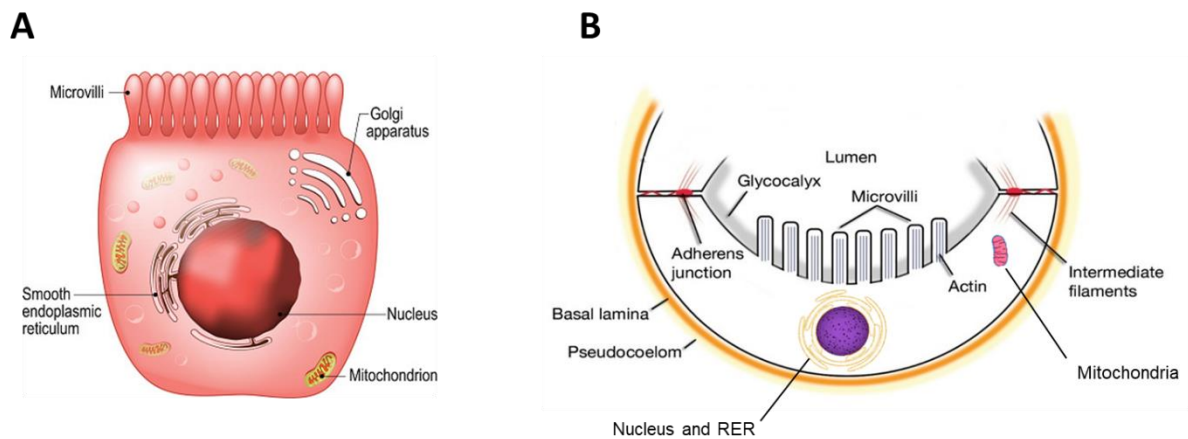


Figure 38 Comparaison de la structure des entérocytes chez l'humain (A) et *C. elegans* (B). Modifié depuis WormAtlas (B) et Shutterstock (B).

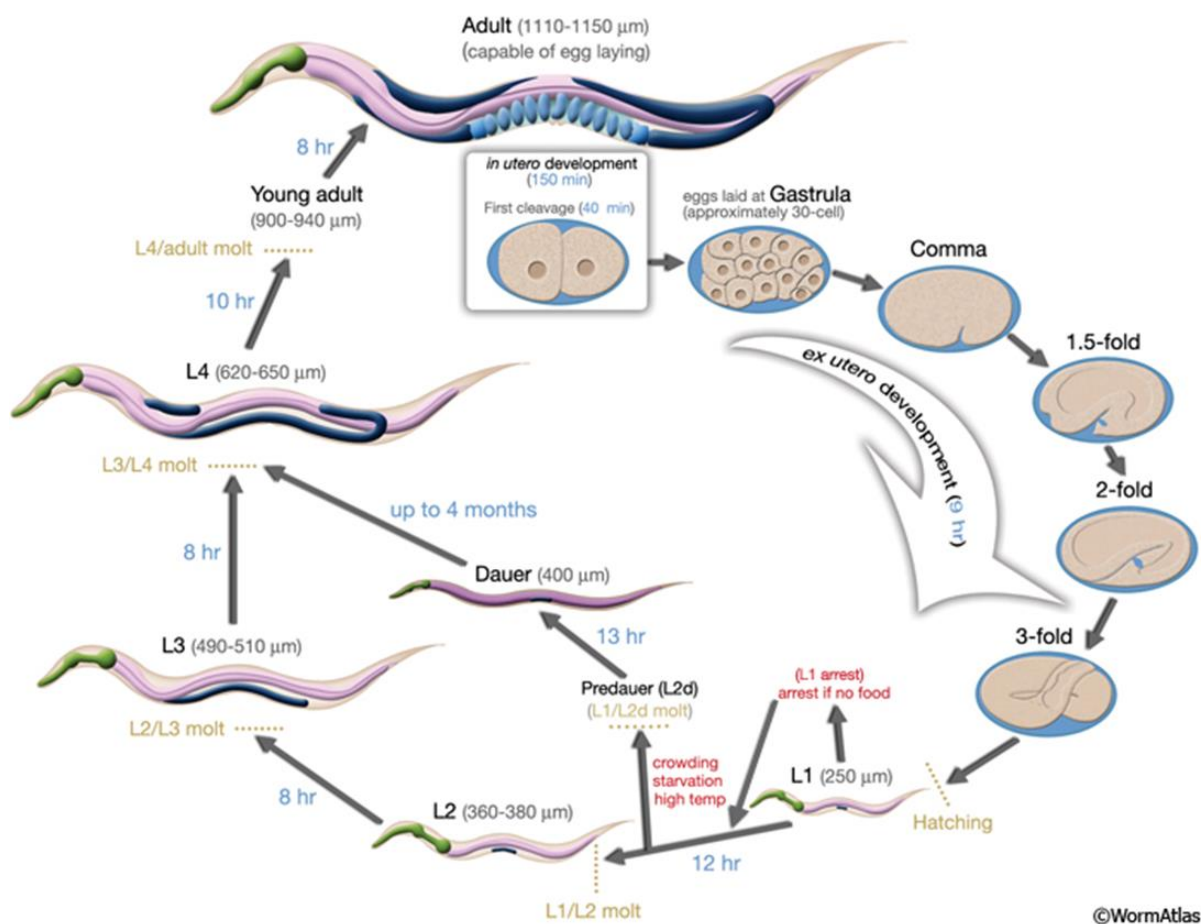


Figure 39 Schéma du cycle de vie du ver à 22°C. Les conditions induisant un stress sont indiquées en rouge, et les passages d'un stade à l'autre en jaune. Image issue de WormAtlas : <http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/mainframe.htm>

Tableau 7 Comparaison des CL50 de plusieurs ETM chez *C. elegans* et de leurs DL50 chez le rat et la souris. Williams et Dusenbery, 1988.

Metal	<i>C. elegans</i> LC ₅₀ (mg/l)		Mammalian LD ₅₀ (mg/kg)		
	With Bacteria	Without Bacteria	Rat	Mouse	Average of All Mammals
Be	50 (41-63)	55 (24-131)	7	7	15
Hg	100 (80-125)	20 (15-26)	0.7	7	15
Al	137 (122-153)	158 (124-202)	34	—	34
Cu	170 (89-325)	100 (79-127)	66	89	57
Zn	347 (286-421)	198 (114-344)	172	168	145
Pb	421 (267-662)	225 (194-261)	—	—	>315
Cd	566 (360-891)	275 (212-356)	54	37	43
Sr	>4000	>4000	1237	1705	961
Rank Correlation, p value (with bacteria)			<0.02	<0.05	<0.01
Rank Correlation, p value (no bacteria)			<0.05	<0.05	<0.05

largement des laboratoires de recherche. Olson *et al.* (2000) concluent que les études animales chez les rongeurs ne sont prédictives qu'à 43 % de la toxicité qui peut exister chez l'humain, et jusqu'à 71 % pour les études associant des espèces de rongeurs et non-rongeurs. Il y a donc un réel intérêt à se tourner vers des modèles animaux autres que les souris et les rats, afin d'obtenir des prédictions plus robustes de ce qu'il peut se passer chez l'humain. Le ver *C. elegans*, de par son cycle de vie très court et sa reproduction très rapide, sa taille et sa simplicité d'entretien, constitue donc un modèle très intéressant. Un adulte hermaphrodite peut produire jusqu'à 300 œufs, ce qui permet d'obtenir un grand nombre de vers en très peu de temps et de place. En France, il ne nécessite pas l'obtention de formation à la manipulation animale pour être utilisé, car d'un point de vue légal les invertébrés ne sont pas concernés par l'encadrement sur l'expérimentation animale. Il représente donc un très bon compromis entre les expériences cellulaires, trop simplistes et qui n'intègrent pas la complexité d'un organisme entier, et les expérimentations animales sur les mammifères, que l'on tente de réduire au maximum par soucis d'éthique.

Etudes de toxicité des métaux chez C. elegans

C. elegans a été déjà utilisé pour des études sur la toxicité des ETM. En 1988, Williams et Dusenbery évoquaient déjà des préoccupations quant à l'utilisation des modèles mammifères en expérimentations animales, proposant *C. elegans* comme très bon modèle de *screening* de la toxicité des métaux (Williams et Dusenbery, 1988). Ils ont en effet montré que les DL50 chez les mammifères (ici rat et souris) sont corrélées aux CL50 observées chez le ver, excepté pour le Cd qui semble beaucoup moins toxique chez ce dernier que dans les modèles mammifères (Tableau 7). Les concentrations létales chez le ver sont beaucoup plus élevées que chez le rat ou la souris, mais la toxicité relative des métaux les uns par rapport aux autres est conservée car cet invertébré est capable de s'adapter et de résister à des environnements très variés et difficiles. Bien des années plus tard, Hunt *et al.* (2012) ont montré des données similaires avec des méthodes employées différentes (en milieu gélosé contre un milieu liquide par exemple). Cette observation vaut également pour les contaminants en général, et pas seulement pour les ETM. Cole *et al.* (2004) ont fait une étude similaire avec 15 pesticides (Figure 40). Non seulement la corrélation entre les CE50 chez le ver et la DL50 chez les rongeurs était souvent très proche, mais les mécanismes d'action toxiques de 5 pesticides sur les 6 testés étaient également similaires. Ils ont ainsi montré que ces pesticides, qui inhibent les deux enzymes cholinestérases chez les mammifères, le font également chez *C. elegans* (Cole *et al.*, 2004). Hunt *et al.* ont également montré dans leur étude de 2012 que le cadmium, qui induit des désordres et des pathologies intestinales chez les mammifères, réduit le diamètre intestinal du ver (Hunt *et al.*, 2012).

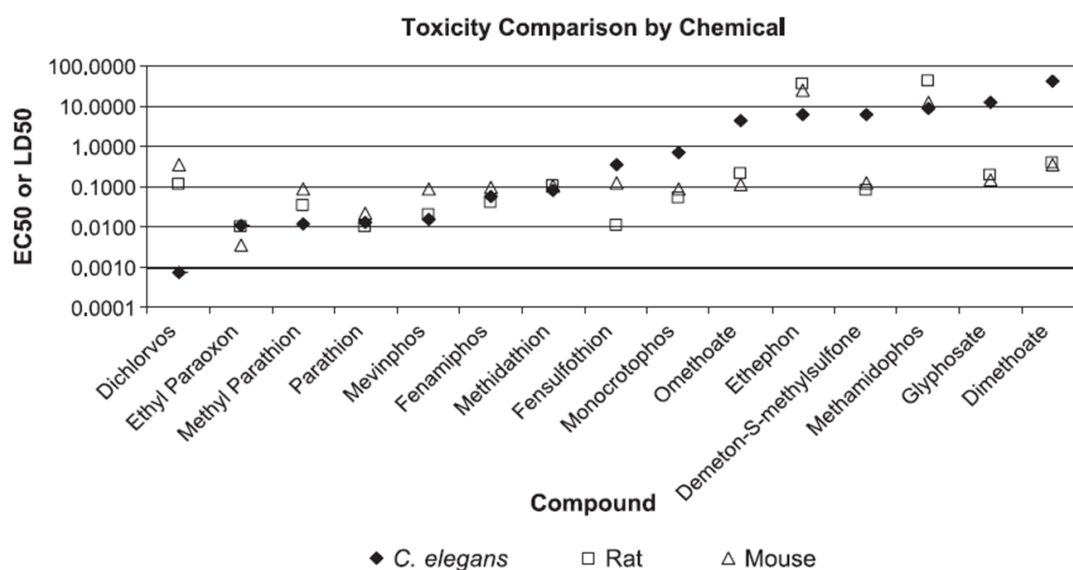


Figure 40 Comparaison des CL50 chez *C. elegans* aux DL50 chez le rat et la souris pour 15 composés. (Cole et al., 2004).

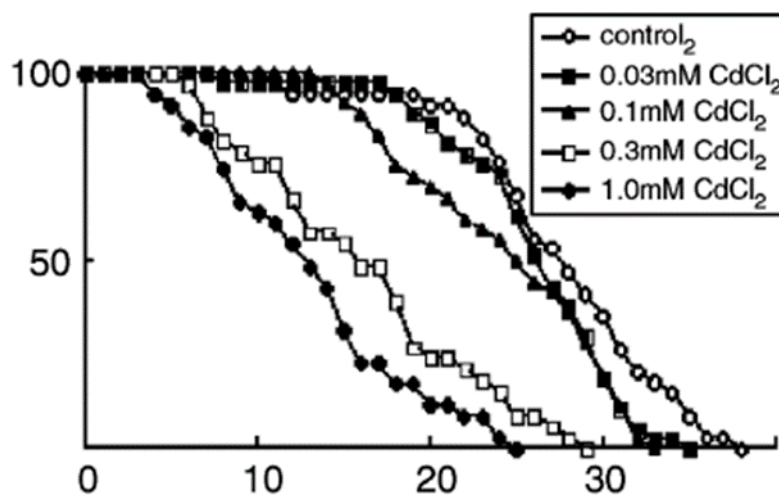


Figure 41 Effet du Cd sur la longévité de *C. elegans*, évaluée en absence (control) ou en présence de différentes concentrations de Cd. Adapté depuis Harada et al., 2007.

La mesure de sa durée de vie, qui peut être raccourcie ou rallongée en présence des métaux, est l'un des paramètres les plus utilisés pour évaluer leur toxicité chez ce ver (Harada *et al.*, 2007 ; Winter *et al.*, 2016 ; Moyson *et al.*, 2018) (Figure 41). Grâce à la simplicité du modèle, une étude de synergie de toxicité des métaux a pu être réalisée en exposant les vers à un métal à la fois, puis à des mélanges de cuivre, zinc et Cd (Moyson *et al.*, 2018). Dans ce travail, les auteurs démontrent bien que le fait d'être exposé à plusieurs métaux augmente leur toxicité, ce qui mime très bien ce qui arrive naturellement. Wah Chu et Chow (2002) démontre la même chose quelques années plus tôt.

Une étude utilisant des chélateurs chimiques des métaux montre qu'il est possible de réduire la toxicité du cadmium, du cuivre, du zinc et du nickel chez les vers (Harrington *et al.*, 2012). Williams et Dusenbery détectent déjà en 1988 que la présence de bactéries sur les boîtes de Pétri, qui servent de nourriture aux vers, diminue la toxicité du métal, suggérant que l'ajout de bactéries sur le milieu de culture du ver permettrait de le protéger de cette toxicité (Williams et Dusenbery, 1988). Dans ce travail, deux souches de vers *C. elegans* ont été utilisées : la souche sauvage N2 et la souche mutée PX627. Cette dernière a pu être générée par la technologie des ciseaux moléculaires CRISPR/Cas9 à partir de la souche N2 (Kasimatis *et al.*, 2018). Cette technique a permis aux auteurs d'ajouter un tag de dégradation inductible à l'auxine au niveau du gène permettant la spermatogénèse du ver *spe-44*, permettant donc l'induction d'une stérilité des vers lorsque ces derniers sont exposés à l'auxine durant leurs stades de développement larvaire (L1 à L4 inclus). Cette exposition n'a aucune incidence sur la survie et le développement des animaux (Zhang *et al.*, 2015). L'utilisation de cette seconde souche a pour avantage d'être moins dangereuse pour la santé humaine. En effet, lors de l'utilisation des vers N2, la stérilité de ces derniers est induite par l'exposition des vers à de la floxuridine ou FUDR, analogue de la pyrimidine. Même s'il a été démontré qu'à la concentration utilisée couramment (*i.e.* 25 μ M), ce composé n'affecte pas la physiologie du ver en général (Gandhi *et al.*, 1980), il n'en reste pas moins toxique pour l'humain. Des études plus récentes semblent également montrer que pour certains mutants en particulier, ce composé augmenterait la survie des vers (Aitlhadj et Stürzenbaum, 2010 ; Van Raamsdonk et Hekimi, 2011) ce qui en fait une méthode à controverse.

Matériel et méthodes

I. Expérimentation chez *Caenorhabditis elegans*

Souches utilisées : La souche de vers sauvages N2 a été obtenue par le biais d'une collaboration interne au sein de l'unité INFINITE U1286 (Dr C. Fradin). La souche de vers PX627 provient du *Caenorhabditis*

Genetics Center (CGC, USA), gracieusement donnée par Jonathan Ewbank, du CIML (Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy), Marseille.

Préparation milieux solides contenant les métaux : Des solutions de concentrations différentes de Pb, Cd et d'Al sont ajoutées à du milieu NGM, ensuite coulées en boîte de Pétri de diamètre 3,5 cm afin d'obtenir des concentrations finales en métaux de 10, 25, 50 et 100 ppm dans la gélose. Ces boîtes sontensemencées avec la souche OP50 d'*Escherichia coli* qui servira de nourriture aux nématodes.

Culture des vers et synchronisation des populations : Les vers sont maintenus en culture à 18°C sur des boîtes *Nematode Growth Medium* (NGM), contenant des bactéries *Escherichia coli* comme source de nourriture (souche OP50). Un *bleaching* permet la synchronisation de la population avant toute expérience. On procède alors à un traitement avec une solution de *bleaching* contenant du NaOH 5M et de la javel 5 %. Cette étape permet la lyse des vers gravides, et la récupération des œufs des nématodes, qui sont resuspendus dans un tampon M9 sans nourriture durant une nuit, afin de les éclore et de synchroniser la population de vers au stade L1.

Evaluation de la survie des vers (Figure 42) : Pour la souche sauvage N2, les larves L1 sont ensuite déposées sur boîte NGMensemencée d'OP50 jusqu'au stade jeune adulte. Pour la souche PX627, les L1 sont déposés sur boîte NGM contenant de l'auxine (acide indole 3-acétique 1mM) etensemencée d'OP50 jusqu'au stade jeune adulte.

Les jeunes adultes, préalablement synchronisés, sont déposés sur ces boîtes, à raison d'environ 20 nématodes par boîte de Pétri. Ils sont ensuite maintenus à 18°C tout le temps de l'expérience. La survie des vers est évaluée quotidiennement en les touchant délicatement sous loupe binoculaire. Si aucune réaction du ver n'est observée, il est considéré mort et évacué de la boîte.

Les courbes de survies sont ensuite créées sur le logiciel GraphPad Prism (version 6.0, GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA).

Evaluation de l'impact des métaux sur la physiologie des vers (Figure 42) : Les larves L1 de la souche PX627 préalablement synchronisées sont mises en culture sur boîte NGM-OP50 sans auxine. Les jeunes adultes sont ensuite transférés sur de nouvelles boîtes NGM-OP50 contenant du Pb et du Cd à raison de 10, 25, 50 et 100 ppm. La ponte des nématodes ainsi que l'éclosion et le développement des larves sont évalués sur 15 jours. Les vers sont transférés tous les trois jours sur de nouvelles boîtes afin de ne pas manquer de nourriture. Des photos au grossissement x 10 sont prises après 3 jours de survie afin d'évaluer la taille et l'aspect des vers.

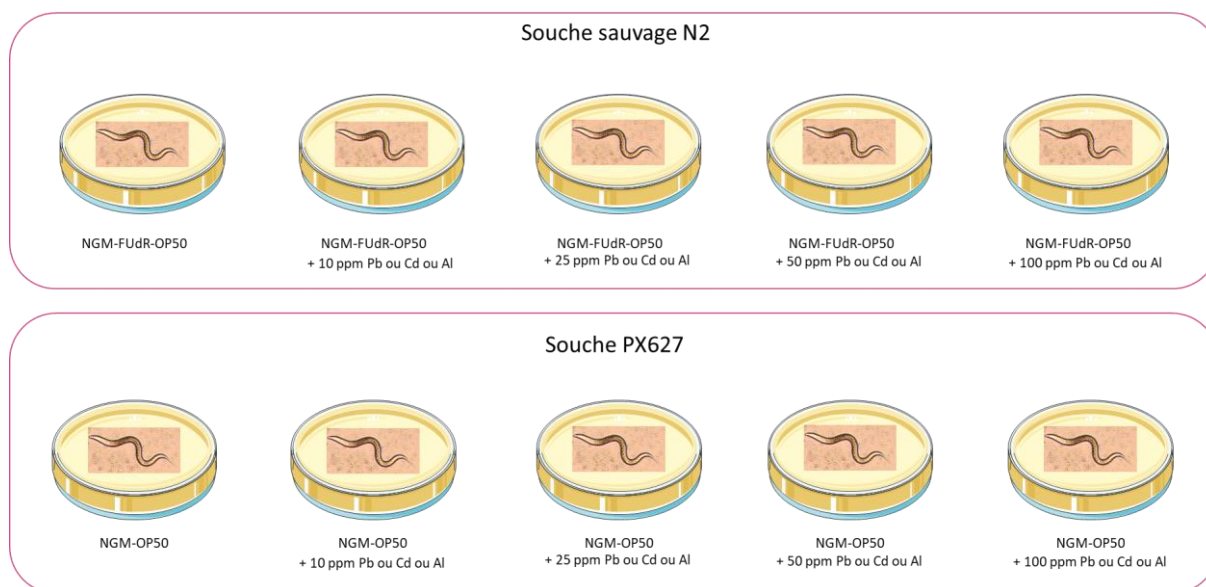


Figure 42 Schéma expérimental d'évaluation de l'impact des métaux sur la longévité de *C. elegans*, soit sur la souche sauvage N2 soit sur la souche OGM PX627.

II. Expérimentations chez la souris

Des souris femelles BALB/c âgées de 6 à 8 semaines sont utilisées pour cette thèse (Janvier Labs, Le Genest-saint-Isle, France). Les animaux sont répartis par groupes de 8 souris par cage, dans une pièce maintenue à $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ avec un cycle journalier jour/nuit de 12h. Pour les alimenter, des croquettes classiques sont utilisées. Un dosage des métaux contenus dans l'alimentation des souris permet de s'assurer qu'elles ne contiennent pas de contaminants. Le protocole utilisé a été validé par le Comité d'Ethique (n° agrément : APAFIS#27146-2020082418105439, avis en annexe). A leur arrivée, les animaux passent *a minima* 7 jours à l'animalerie pour acclimatation.

Expérience HM1 : Les souris sont gavées 2 fois par jour avec 250 μL d'une suspension bactérienne calibrée à 10^9 UFC/mL durant 3 jours, et reçoivent un biberon contenant 25 ppm de Pb au moment du second gavage (J2 soir). La veille du sacrifice, après le dernier gavage, les biberons contenant du Pb sont remplacés par des biberons d'eau.

Expérience HM 2 : Les souris sont gavées 2 fois par jour avec 500 μL d'une suspension bactérienne calibrée à 10^9 UFC/mL durant 6 jours, et reçoivent un biberon contenant environ 70 ppm de Pb.

Le sang est récupéré dans des tubes héparinés avant le sacrifice, et les organes *post-mortem*. Les organes sont ensuite minéralisés par l'ajout de 1 mL d'acide nitrique 69 % (VWR Chemicals, France), puis chauffés 1 heure à 98°C . Les échantillons obtenus sont dilués (eau milliQ, acide nitrique, butanol, triton) pour analyse des métaux par ICP-MS (Thermo ICAP Q, Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France).

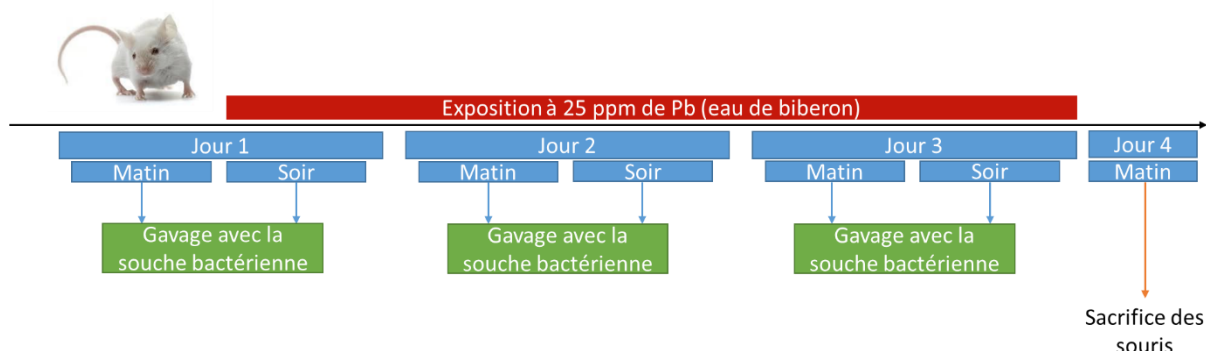


Figure 44 Schéma expérimental de l'expérimentation animale HM1.

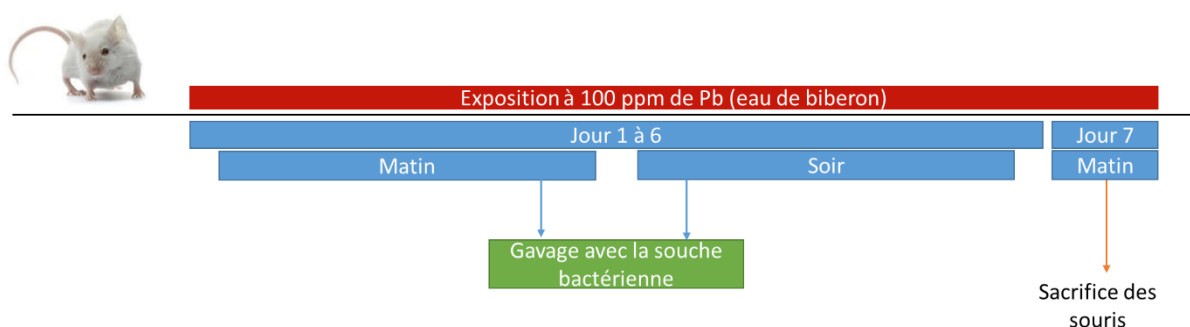


Figure 43 Schéma expérimental de l'expérimentation animale HM2.

Résultats expérimentaux

I. Expérimentation chez *Caenorhabditis elegans*

1. Survie des vers N2 en présence de Pb et de Cd

Des premières expériences ont été réalisées sur la souche de vers sauvages N2. Après synchronisation de la population de larves L1, les larves se développent jusqu'au stade fin-L4/jeune adulte sur une boîte de NGMensemencée de la souche d'*E. coli* OP50 comme nourriture. Les jeunes adultes sont ensuite transférés sur de nouvelles boîtes de NGM contenant du FUDR (empêchant leur reproduction) et des concentrations données de métal (*i.e.* 10, 25, 50 et 100 ppm de Pb ou de Cd). Ils sont incubés durant toute l'expérience à une température de 18°C. La survie des vers est évaluée presque quotidiennement, et la mortalité indexée dans le logiciel GraphPad afin de réaliser des courbes de survie (Figure 45 A et B). En présence de plomb, la survie des vers est similaire à celle des vers sur les boîtes témoins (Figure 45A). Seule la concentration de 100 ppm induit un *shift* de mortalité précoce d'environ 6 jours (100 % de mortalité au J18 contre J24 respectivement). Aucun comportement particulier des vers exposés au métal n'a été observé. En revanche, la présence de Cd induit une

surmortalité chez les vers N2 (Figure 45B). La mortalité atteint 100 % à J19 pour une concentration de 10 ppm de Cd, J12 pour la concentration de 25 ppm, J8 pour la concentration de 50 ppm et J11 pour la concentration de 100 ppm (Figure 45B). Une différence de mortalité est donc clairement observable pour le Cd. Dès le J4 de survie, un comportement de fuite est observé : tous les vers sont retrouvés sur les contours de la boîte, essayant de fuir le Cd présent dans la boîte de Pétri. Ce phénomène est observé pour les concentrations de 25, 50 et 100 ppm de Cd.

2. Survie des vers PX627 en présence de Pb, Cd et Al

La survie en présence de métaux a également été évaluée sur la souche de ver PX627. Cette fois, les larves L1 synchronisées sont déposées sur une boîte NGMensemencée d'*E. coli* OP50 contenant de l'auxine afin de les rendre stériles. Quand les vers se sont développés jusqu'au stade jeune adulte, ils sont transférés sur des boîtes NGM contenant simplement des concentrations de métal différentes (*i.e.* 10 ppm, 25 ppm, 50 ppm, et 100 ppm de Pb, de Cd et d'Al). Les courbes de survie des vers exposés au Pb sont similaires à celle des témoins (Figure 45C). Il est à noter que ces vers, de façon naturelle, survivent plus longtemps que les vers N2 alors que la température d'expérience est restée la même, c'est-à-dire 18 °C (33 jours contre 24 jours pour la souche N2). Les vers PX627 semblent connaître une mortalité encore plus marquée au contact du Cd que la souche N2. Alors que la concentration de 10 ppm induisait un shift de mortalité de 5 jours, on atteint 100 % de mortalité chez les PX627 après 21 jours, soit 12 jours avant les témoins (Figure 45D). Cette mortalité est atteinte après 19 jours pour la concentration de 25 ppm de Cd. Les concentrations de 50 ppm et 100 ppm de Cd sont particulièrement nocives pour les vers PX627 car le taux de 100 % de mortalité est atteint à, respectivement, 4 et 1 jours (Figure 45D). L'aluminium quant à lui ne semble pas affecter les nématodes : les courbes de survie des vers en contact des 4 concentrations d'Al suivent sensiblement la courbe des témoins (Figure 45E).

Aucun comportement particulier, notamment de fuite, n'a été observé chez cette souche, sur aucune des boîtes.

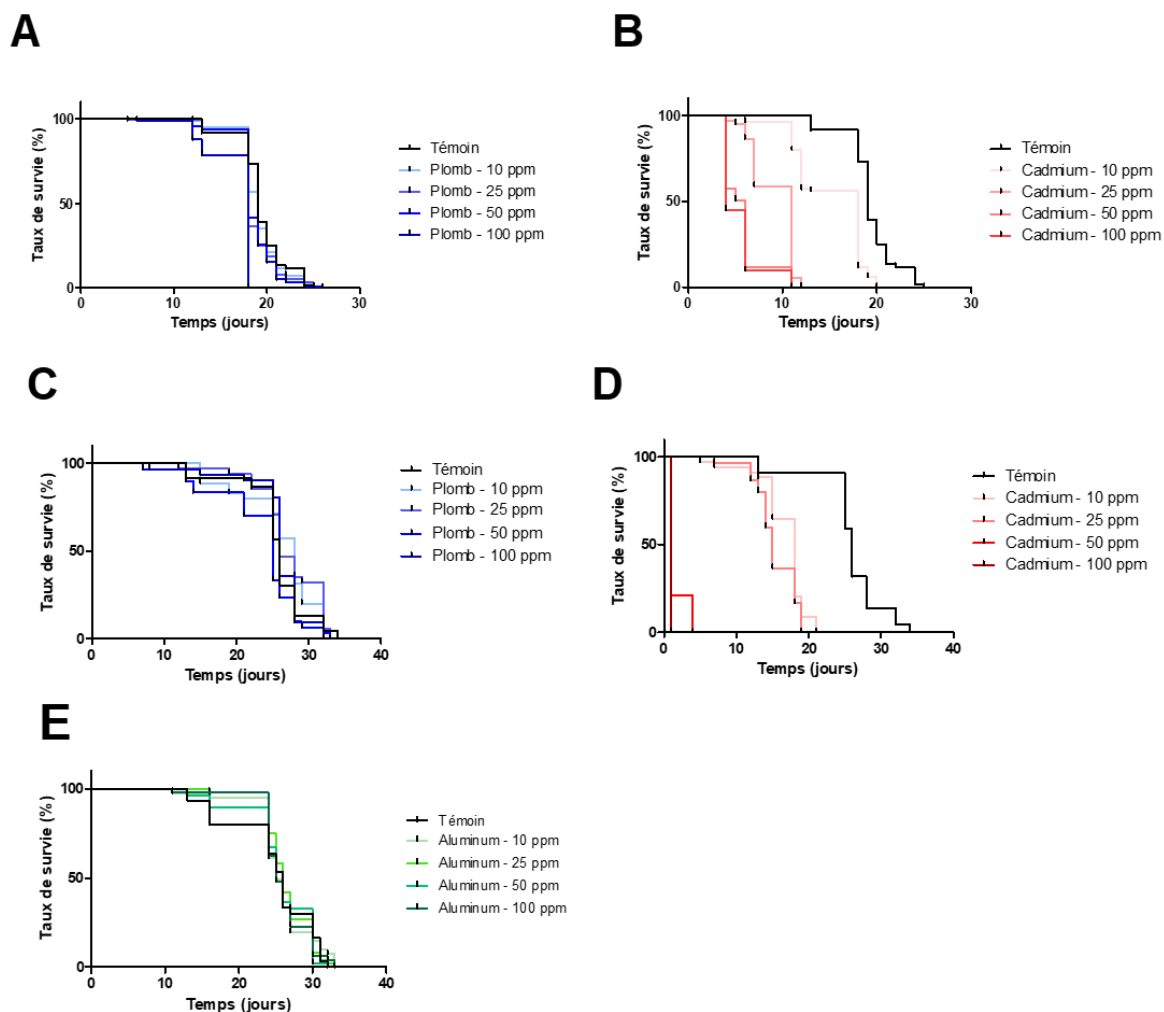


Figure 45 Évaluation de l'impact des métaux sur la longévité des vers *C. elegans*. Impact du Pb (A) et du Cd (B) sur la souche N2. Impact du Pb (C), du Cd (D) et de l'Al (E) sur la souche PX627.

3. Effet du Cd sur la physiologie du vers PX627

Le Cd est non seulement particulièrement toxique pour les vers PX627, mais il agit aussi sur leur physiologie. Des vers non-stérilisés, c'est-à-dire s'étant développés sur des boîtes NGM-OP50 sans auxine jusqu'au stade jeune adulte, sont transférés sur des boîtes contenant des métaux ou non. De la nourriture leur est fournie par le biais d'une culture d'OP50 sur la gélose comme pour les expériences précédentes. Des photos réalisées à 3 jours de survie permettent d'évaluer l'aspect des vers (Figure 46). Les vers exposés à 100 ppm de Pb semblent normaux : ils font la même taille que les témoins et semblent de la même épaisseur (Figure 46B). Les vers exposés à 10 ppm de Cd sont déjà de plus petite taille, mais gardent une épaisseur raisonnable comparativement à leur taille (Figure 46C). Les vers exposés aux concentrations supérieures (25 ppm, 50 ppm et 100 ppm de Cd) ont en revanche un aspect très différent : ils semblent chétifs, font la moitié de la taille des vers témoins et sont

beaucoup plus fins (Figure 46D-E-F). Au-delà de l'aspect externe du ver, la reproduction semble également affectée. Les vers exposés à 100 ppm de Pb se reproduisent très peu comparés aux vers témoins où la quantité d'œufs est indénombrable (Tableau 8). Même si ces œufs sont capables d'éclore et de donner des larves, celles-ci ne se développent pas et finissent par mourir à un apparent stade L1 après une dizaine de jours de survie. Au contraire, même si les vers exposés à 10 ppm de Cd se reproduisent très peu, les quelques œufs pondus se sont développés en larves qui ont grandi en jeunes adultes (Tableau). Ces jeunes adultes semblaient en revanche stériles car aucun nouvel œuf n'a été pondu jusqu'à la fin de l'expérience. Les concentrations de 25 à 100 ppm semblent en revanche rendre complètement stériles les nématodes : aucun œuf n'a été pondu jusqu'à la mort des vers.

4. Conclusion

Le ver *C. elegans* ne semble pas être le meilleur modèle pour notre thématique. Même s'il est très utilisé dans les études de toxicité pour la détermination des CL50, l'étude de l'effet des ETM sur sa longévité, et donc de l'effet potentiellement protecteur de souches bactériennes contre cette toxicité semble compliquée. En effet, les métaux étudiés ici, *i.e.* le Pb(II), le Cd(II) et l'Al(III) ne sont pas toxiques pour le ver aux concentrations que nous utilisons pour la chélation des métaux. Le Pb et l'Al, même à de fortes concentrations n'affectent pas significativement la longévité du vers. Le Cd a un réel effet toxique à 10 et 25 ppm chez la souche PX627, avec un *shift* de survie 12 jours. Il aurait alors été intéressant de remplacer la nourriture du ver (*E. coli* OP50) par des bactéries chélatrices de Cd. Le souci étant qu'à ces concentrations, nous n'avons pas pu identifier de souches permettant de capter le Cd. Pour rappel, seules 5 souches bactériennes chélaient plus de 31 % de 1 ppm de Cd, chélations qui baissent à moins de 10 % de 25 ppm.

Pour autant, même s'il n'est pas indiqué dans notre étude, il reste un modèle très intéressant et peu coûteux qui mérite d'être testé en supplément du modèle rongeur communément utilisé.

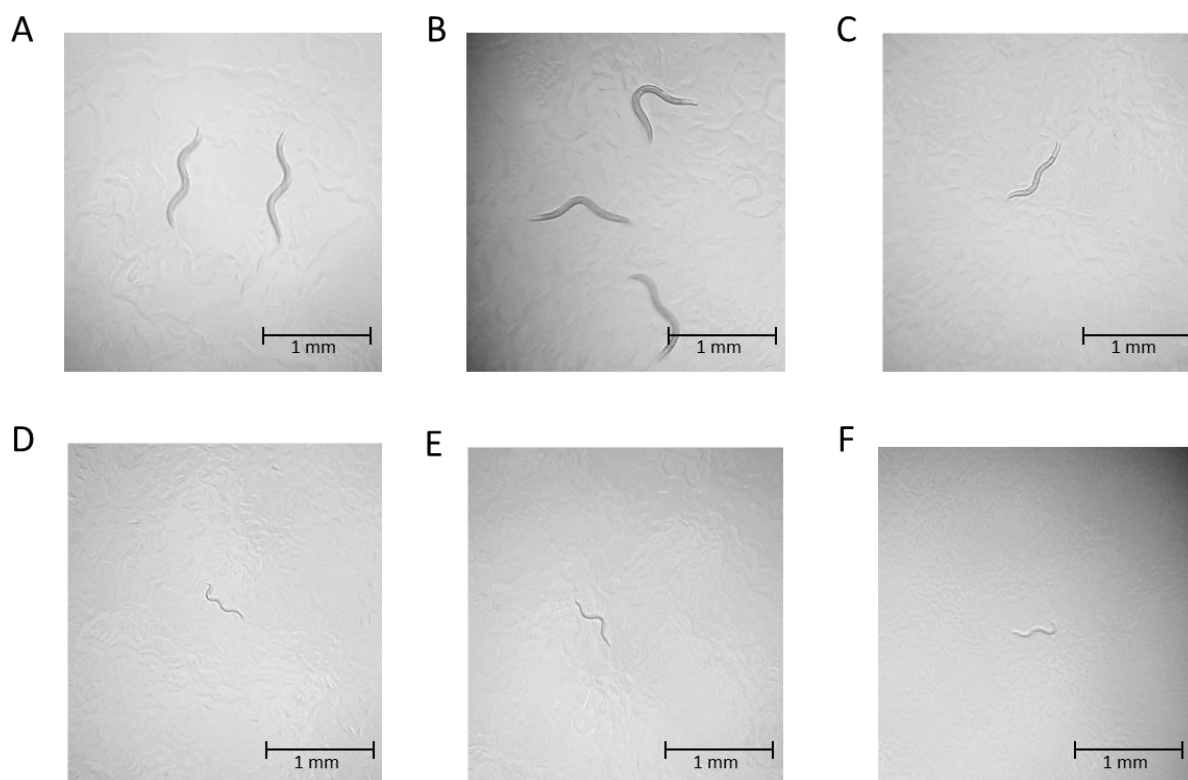


Figure 46 Photographies des vers *C. elegans* PX627 au grossissement x 10 à 3 jours de survie en absence de métal (A), en présence de 100 ppm de Pb (B), 10 ppm de Cd (C), 25 ppm de Cd (D), 50 ppm de Cd (E) et 100 ppm de Cd (F).

Tableau 8 Évaluation de l'effet des métaux sur la physiologie et la reproduction de la souche PX627.

	Témoin	10 à 50 ppm de Pb	100 ppm de Pb	10 ppm de Cd	25 à 100 ppm de Cd
Aspect du ver	Normal	Normal	Normal	Très petits et fins	Très petits et fins
Taille	1 mm	1 mm	1 mm	0,7 mm	0,5 mm
Reproduction	Oui	Oui	Très peu	Très très peu	Non
Eclosion des œufs	Oui	Oui	Oui	Oui	/
Développement des larves	Oui	Oui	Non	Oui	/

II. Expérimentation chez la souris *Mus musculus*

Le modèle *C. elegans* n'étant pas approprié pour notre étude, nous avons donc décidé de passer chez le modèle rongeur pour évaluer la capacité *in vivo* de nos souches à limiter la toxicité des métaux en réduisant leur biodisponibilité. Le *screening* des souches *in vitro* ayant montré les meilleurs résultats avec le plomb, les premières expériences animales sont réalisées sur ce métal. Deux expériences ont alors été conduites : HM1 et HM2 (*Heavy metals* 1 et 2) (Figure 42 et 43).

Lors d'HM1, les souris reçoivent une suspension bactérienne d'environ 10^9 UFC/mL matin et soir, accompagnée d'un biberon contenant 25 ppm de Pb pendant 3 jours. Des souris buvant de l'eau non contaminée servent de témoin négatif d'exposition ; au contraire, des souris buvant de l'eau contaminée en Pb servent de témoin positif d'exposition. Deux souches sont ensuite sélectionnées sur la base du *screening* comme étant d'excellentes chélatrices de plomb : *L. fermentum* FPL 19124 (91,61 %) et *L. reuteri* DSM 20016 (92,14 %). Deux autres souches sélectionnées comme étant de faibles chélatrices sont également intégrées à l'expérience : *L. composti* (6,01 %) et *L. selangorensis* (6,31 %). Après sacrifice, la quantité de Pb est dosée dans les organes (rate, rein, foie), les fèces et le sang. En parallèle, la quantité de certains éléments essentiels (cuivre, zinc, sélénium, manganèse, vanadium, nickel) ainsi que d'autres contaminants métalliques (arsenic et cadmium) est dosée également. Une différence significative ($p < 0,001$) est observée entre le poids des rates des animaux témoins et celles des animaux recevant uniquement du plomb dans leur biberon (Figure 47). Cette splénomégalie pourrait être due à une inflammation ou une hémolyse, elles-mêmes pouvant être provoquées par le plomb (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2000).

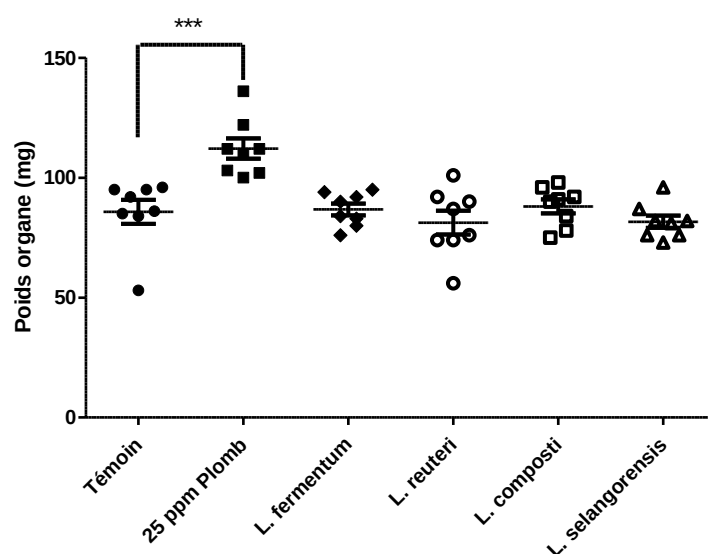


Figure 47 Poids des rates des souris témoins, recevant du Pb ou du Pb accompagné de gavages de *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. composti* ou *L. selangorensis*

Ainsi, des augmentations de la plombémie (Figure 48 A), de la quantité de plomb dans le rein (Figure 48 B) et l'excrétion dans les fèces (Figure 48 C) des souris exposées à 25 ppm de Pb comparativement aux témoins sont observées. Les quantités de plomb observées dans la rate et le foie ne sont pas différentes entre les différentes conditions (données non montrées). En revanche, ces taux ne sont pas diminués en présence des bactéries. *L. fermentum* semble au contraire avoir un effet plus délétère, avec une accumulation de plomb plus importante dans la circulation sanguine ainsi que dans le rein (Figure 48). Cela s'accompagne également d'une plus forte excrétion du plomb dans les fèces, ce qui pourrait laisser penser que les souris aient bu plus d'eau contaminée comparativement aux autres cages, expliquant une plus forte exposition et donc une plus forte accumulation dans l'organisme. Les taux d'éléments essentiels ou autres contaminants ne sont pas non plus affectés, ni par la présence de Pb, ni par la présence des bactéries. A titre d'exemple, les concentrations en cuivre, zinc, manganèse et sélénium sont affichées dans le manuscrit (Figure 49). Les différences de concentrations en Pb entre les témoins positifs et négatifs ne sont pas significatives, ainsi aucune différence ne peut alors être observée avec l'administration des bactéries : les concentrations se retrouvent entre celles des

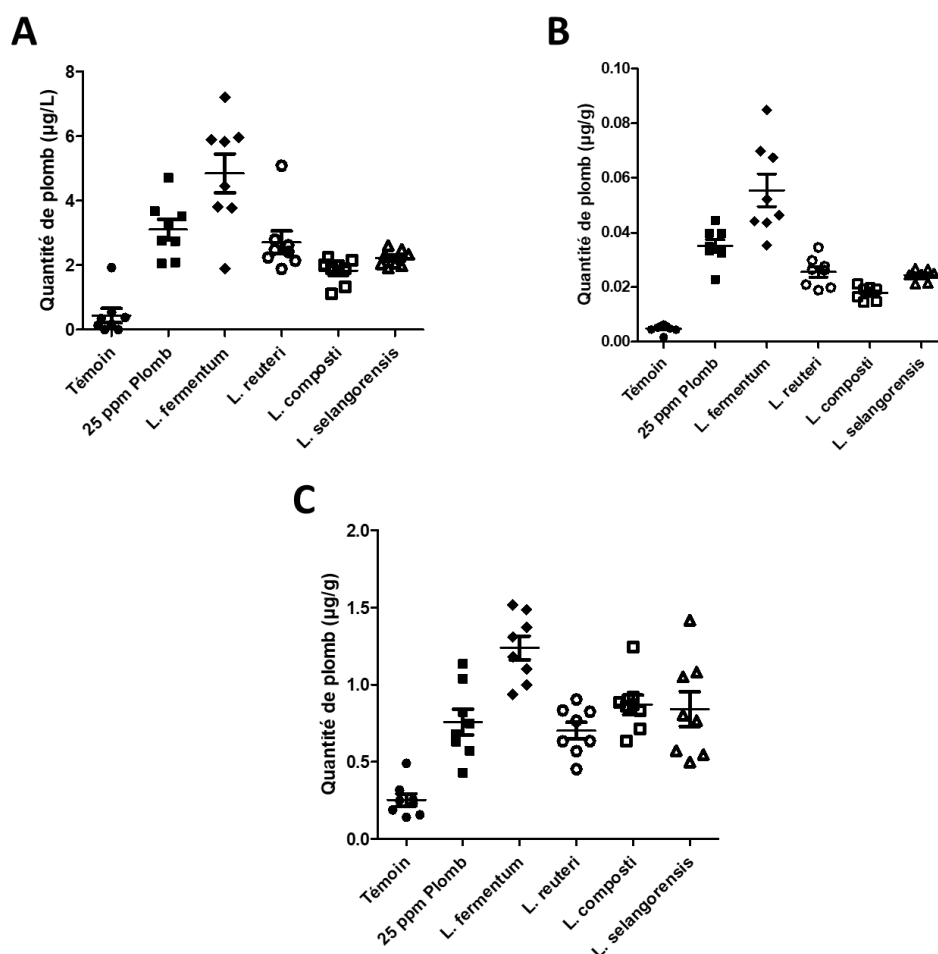


Figure 48 Quantité de plomb dans le sang (A), dans le rein (B) et les fèces (C) des souris HM1.

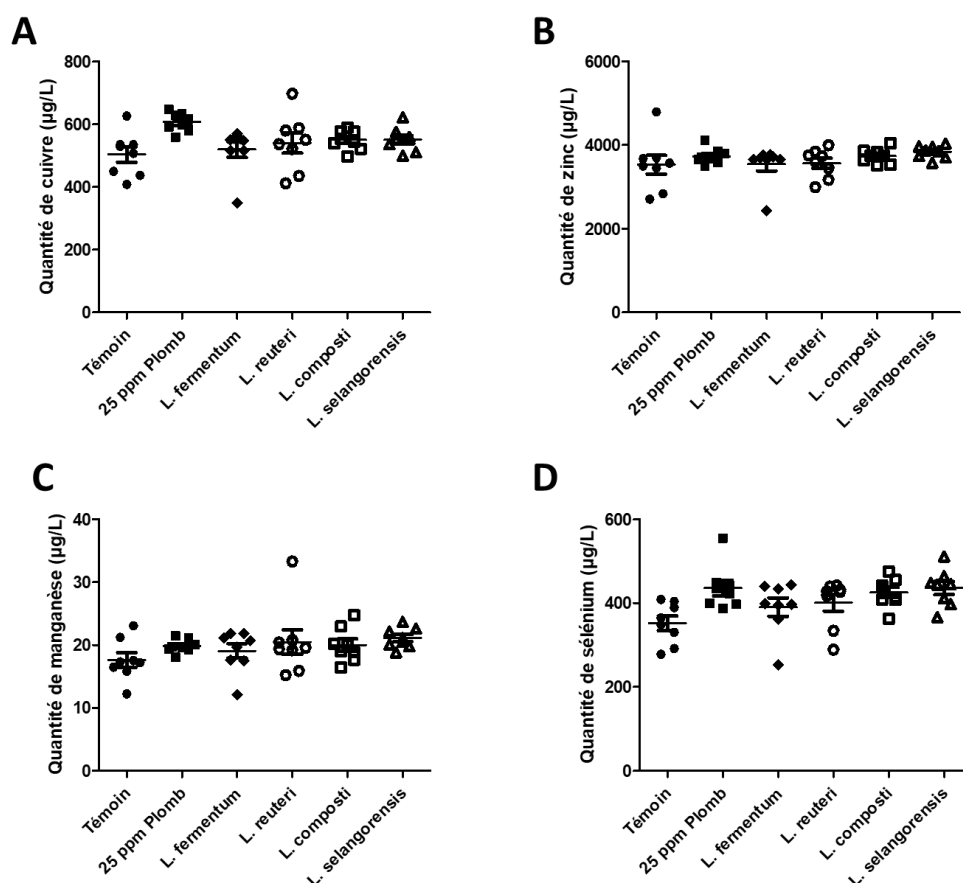


Figure 49 Concentrations en cuivre (A), zinc (B), manganèse (C) et sélénium (D) dans le sang des souris HM1.

témoins, sans réelles significativités. Nous avons alors envisagé d'affiner l'expérience, en augmentant les doses de plomb auxquelles sont exposées les souris à 70 ppm (expérience **HM2**). Afin de s'assurer que les bactéries soient assez présentes pour capter le plomb, les gavages matin et soir ont été maintenus mais avec 500 µL de suspension bactérienne, contre 250 µL pour l'expérience HM1. De même, le temps de l'expérience a été allongé à 6 jours au lieu de 3 jours précédemment. La souche *L. reuteri* DSM 20016 fortement chélatrice a été remplacée par la souche *L. nodensis* DSM 19682 (90,40 %). Cette fois, une différence significative des plombémies (Figure 50A), des concentrations en plomb dans le rein (Figure 50B) et dans les fèces (Figure 50C) est observé pour toutes les conditions comparativement aux souris témoins non-exposées. Aucune différence significative n'a en revanche été observée entre ces différentes conditions et les souris témoins exposées à 70 ppm de Pb. Cela suggère que les bactéries ne permettent pas de capter le plomb ingéré dans l'eau de biberon : le métal passe la barrière intestinale, se retrouve dans la circulation sanguine (Figure 50A), puis s'accumule dans les organes de la même façon que chez les souris ne recevant pas de bactéries (Figure 50B et C).

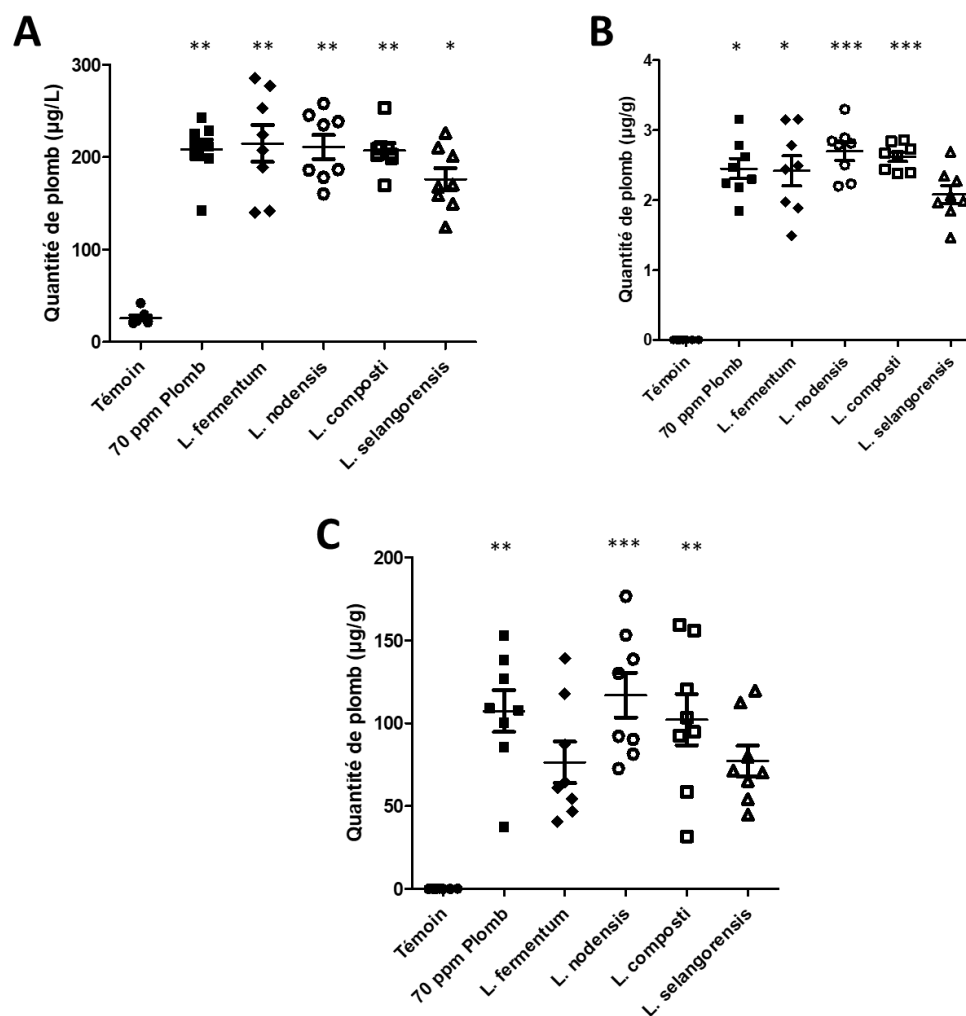


Figure 50 Quantités de plomb dans le sang (A), dans le rein (B) et les fèces (C) des souris HM2.

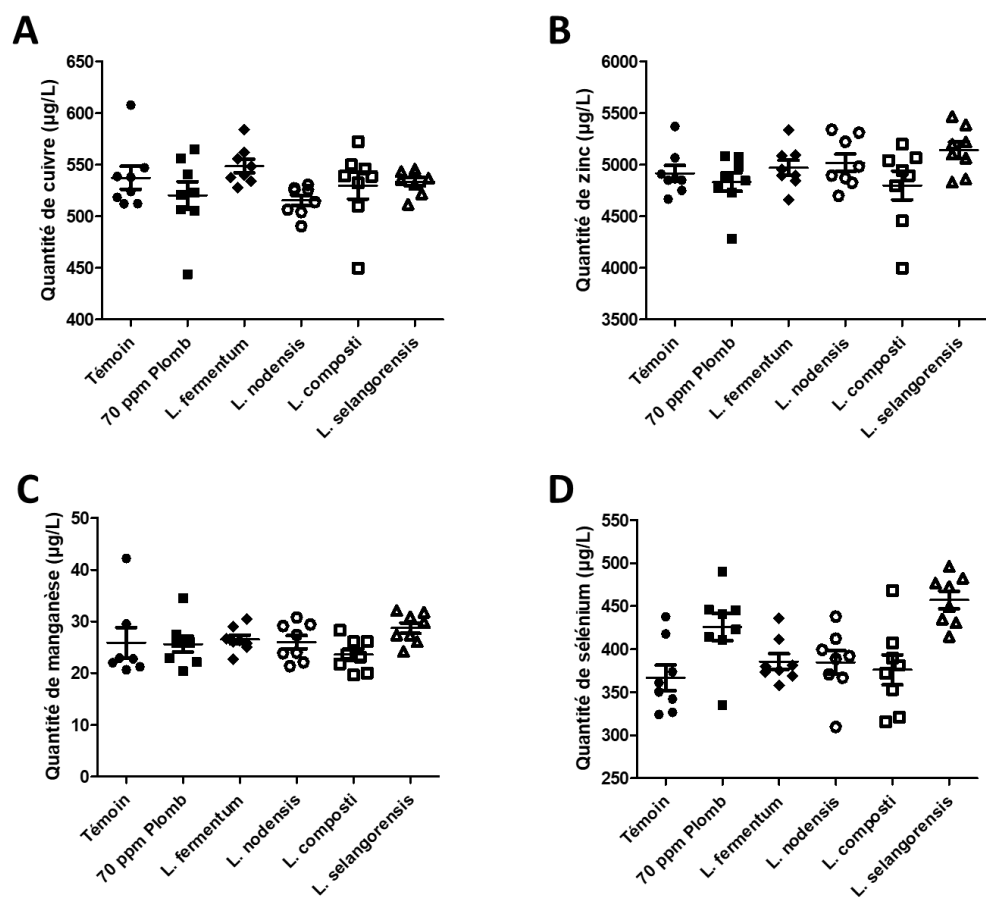


Figure 51 Concentrations en cuivre (A), zinc (B), manganèse (C) et sélénium (D) dans le sang des souris HM2.

Conclusion

Malgré un intérêt certain dans le domaine de la biologie, le nématode *C. elegans* s'est révélé n'être pas adapté à notre étude. Le ver étant particulièrement résistant aux conditions extrêmes, et notamment aux environnements défavorables, il a déjà été décrit comme plus résistants aux métaux lourds que les mammifères (William et Dusenbery, 1988 ; Hunt *et al.*, 2012). Les concentrations utilisées dans notre étude *in vitro*, reflétant une exposition réelle de l'humain aux ETM, s'avèrent donc non-toxiques pour ce modèle. Les concentrations toxiques sont très éloignées, et les bactéries testées ici incapables de capter de si fortes concentrations. C'est pourquoi, le modèle *Caenorhabditis elegans* a été abandonné ici. Il reste malgré tout d'un très grand intérêt pour d'autres études, notamment dans le cadre des probiotiques, lorsqu'il s'agit de mieux comprendre les mécanismes par lesquels ils agissent (Poupet *et al.*, 2019).

Le modèle animal souris a donc été envisagé. Une première expérience, réalisée avec une contamination en Pb de 25 ppm dans l'eau de biberon des souris, n'a pas abouti à des résultats réellement probants. En effet, le métal s'accumulait trop peu dans les organes et dans la circulation sanguine pour induire une différence significative entre les témoins négatifs (eau du robinet) et positifs (eau contaminée). Les résultats entre les différents groupes ayant reçu les bactéries n'étaient donc pas, à leur tour, significatifs. Afin de pallier ce problème, nous avons décidé de multiplier à la fois la dose de Pb dans l'eau, mais aussi la durée de l'expérience, passant ainsi à 70 ppm et 6 jours, majorant d'un facteur 5 l'exposition aiguë. Cette fois, une différence significative est bien observée entre les deux témoins. En revanche, l'apport quotidien de bactéries n'a pas permis de diminuer la plombémie des souris, et par extension n'a pas permis de diminuer l'accumulation du toxique dans les organes. La performance de chélation des souches évaluée *in vitro* ne permet pas ici d'être prédictive d'une efficacité *in vivo*, les souches faiblement ou fortement chélatrices offrant des niveaux similaires d'accumulation du métal dans les organes. Plusieurs études ont pourtant déjà montré que des gavages en bactéries permettaient de réduire l'effet toxique du plomb dans l'organisme (Tian *et al.*, 2012 ; Li *et al.*, 2017 ; Zhai *et al.*, 2020). Les traitements utilisés sont différents, à la fois en souche bactérienne mais aussi en métal et en durée de l'expérience : les conditions adéquates n'ont peut-être pas encore été trouvées dans notre cas. Ces expériences nous ont malgré tout permis de nous assurer que l'apport journalier en bactéries ne perturbe pas l'équilibre des métaux essentiels. En effet, aucune différence dans la quantité de cuivre, zinc, sélénium, manganèse, vanadium et nickel n'a été observée.

Chapitre 3 : Effet du Tween 80 sur la capacité de chélation des métaux par les Propionibactéries

Les détergents

Historiquement, les premiers détergents utilisés sont les saponines, issues des plantes, et déjà décrites en Égypte antique. Les premiers détergents chimiques de synthèse ont été créés pendant la Première Guerre Mondiale, afin de remplacer le savon classique qui se faisait une denrée rare. Ces composés chimiques possèdent entre autres des propriétés tensioactives. Ce sont des molécules amphiphiles, c'est-à-dire qu'elles possèdent à la fois une partie hydrophile permettant de créer des liaisons avec l'eau (tête polaire), et une partie hydrophobe attirant quant à elle les lipides (chaîne carbonée). Ces détergents sont généralement utilisés pour le nettoyage des surfaces, entrent dans la composition des cosmétiques ou de l'alimentation comme agents mouillants, émulsifiants ou moussants. La structure des tensio-actifs est très proche de celle des lipides qui composent les membranes biologiques, la seule différence étant que ces dernières possèdent deux chaînes hydrophobes fixées à la tête hydrophile. C'est grâce à cette propriété que les détergents permettent de détacher les graisses présentes sur une surface par exemple, car ils se glissent à l'interface eau-lipide et créent des micelles. Il existe différents types de détergents, classés en fonction des propriétés de la tête polaire (Tableau 9), selon leur solubilité dans l'eau ou leur paramètre HLB (*Hydrophile-Lipophile Balance*) (Linke, 2009).

Tableau 9 Exemples de détergents classés en fonction de leur typologie, et leur utilisation en laboratoire.

Typologie	Nom du détergent	Exemple d'utilisation
Anionique	SDS (dodécylsulfate de sodium)	Tampon de biologie moléculaire, additif alimentaire (E487), produits cosmétiques (effet moussant)
	Docusate de sodium	Additif alimentaire (E480), principe actif médicamenteux, excipients médicamenteux
Cationique	Chlorure de cétylpyridinium	Antiseptique (bains de bouche, sprays bucaux...), contenu dans certains pesticides
	Chlorure de benzalkonium	Conservateur dans les produits pharmaceutiques
Zwitterionique	CHAPS	Tampon de biologie cellulaire et moléculaire
	Bétaïne de cocamidopropyle	Principe actif de cosmétiques (shampooing, gel douche...)
Non-ionique	Les polysorbates ou Tween	Additifs alimentaires, tampon de biologie/biochimie
	Triton X-100	Tampon de biologie cellulaire et moléculaire
	NP-40	Tampon de biologie cellulaire et moléculaire, fabrication de textile et les peintures

Beaucoup de ces détergents sont couramment utilisés dans les laboratoires de recherche pour leur propriété de déstructuration des membranes. Le Triton X-100 et son dérivé le NP-40 sont notamment utilisés dans les procédés de biologie cellulaire, la seule différence entre ces deux composés étant le

nombre d'atomes de carbone composant la chaîne aliphatique (hydrophobe) de la molécule. Certains détergents très courants en laboratoire sont également très utilisés en tant qu'additifs alimentaires, comme les polysorbates ou le SDS.

Le SDS est un détergent anionique (Figure 52). Il dénature les protéines en rompant les liaisons non-covalentes entre et au sein des protéines. Comme il se lie à ces protéines dénaturées, il masque la charge naturelle de la protéine en question, la rendant ainsi chargée négativement grâce à sa tête polaire formée d'un sulfate. Il est également utilisé comme additif alimentaire sous le numéro E487.

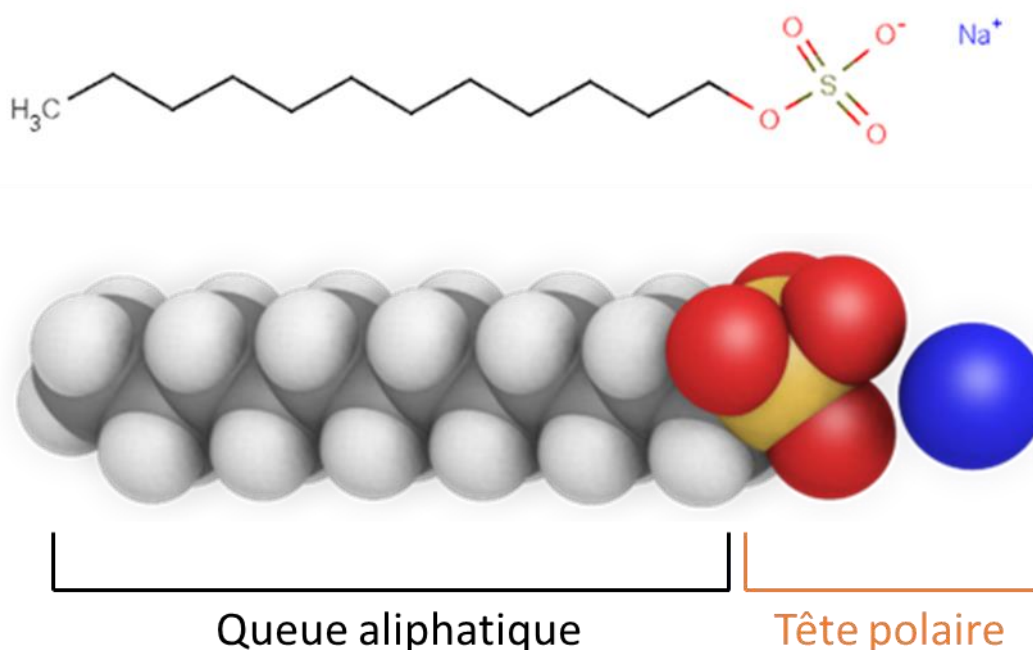


Figure 52 Structure du SDS. Adapté depuis World of Chemicals

<https://www.worldofchemicals.com/chemicals/chemical-properties/sodium-lauryl-sulfate.html>

Le désoxycholate de sodium, ou acide désoxycholique (Figure 53), est un sel biliaire, couramment retrouvé dans l'intestin car produit par le microbiote intestinal lors du métabolisme de l'acide cholique (lui-même synthétisé par le foie). Il a pour but d'aider à l'absorption des graisses par la muqueuse intestinale. C'est également un détergent anionique, mais qui est non-dénaturant. Depuis 2015, il est utilisé sous forme injectable dans certains pays (comme les USA) pour l'élimination des graisses adipeuses présentes au niveau du menton (ANSM, 2018).

Le CHAPS est un détergent dit zwitterionique car il possède des à la fois une charge positive (NH_3^+) et une charge négative (COO^-) (Figure 53). Il est fréquemment utilisé pour l'immunoprécipitation des

protéines car il a la propriété d'être non-dénaturant. Il permet également de solubiliser des protéines membranaires, habituellement très difficile à isoler de par leur caractère très hydrophobe.

Le Triton X-100 et le NP-40 sont des détergents non-ioniques très proches, dont la seule différence tient au nombre de carbone dans la queue hydrophobe (Figure 53). Ils sont principalement utilisés pour la lyse cellulaire car ils sont capables de lyser les membranes cytoplasmiques également, et donc particulièrement indiqués pour l'extraction d'ADN par exemple. Mais ils peuvent également servir à éliminer d'autres détergents afin de reconformer les protéines précédemment solubilisées par des détergents dénaturants (comme le SDS).

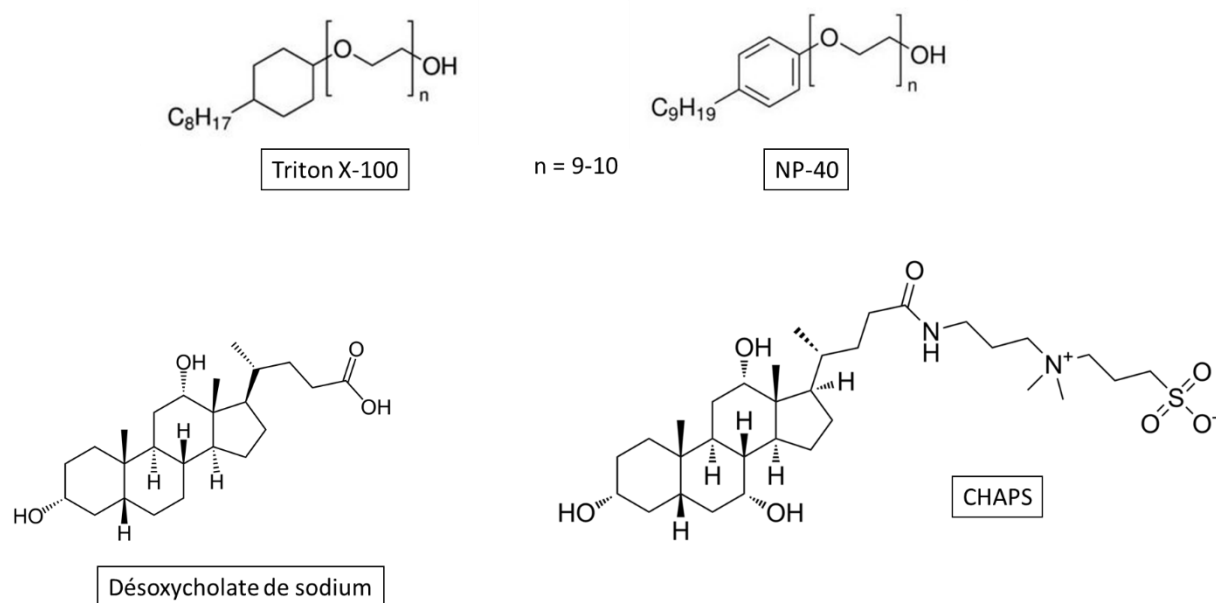


Figure 53 Structures chimiques de différents détergents couramment utilisés en laboratoire.

Les polysorbates, ou Tween : les polysorbates sont plus couramment désignés par « Tween », qui est leur nom de commercialisation par l'entreprise Croda International plc. Il en existe une multitude, et cinq d'entre eux sont utilisés comme additifs alimentaires : le Tween 20 (E432), le Tween 40 (E434), le Tween 60 (E435), le Tween 65 (E436) et le Tween 80 (E433) (Figure 54). La différence entre toutes ces formules est la composition en acides de la queue hydrophobe, *i.e.* laurique pour le Tween 20, oléique pour le Tween 80, et palmitique pour les Tween 40, 60 et 65. Le Tween 65 est en fait un dérivé du Tween 60, et possède 3 chaînes hydrophobes, ce qui le rend beaucoup moins facilement soluble dans l'eau. Ces détergents sont très utilisés comme agents de lavage dans les expériences de biologie moléculaire, comme l'ELISA ou le *Western Blot*. Leur gros avantage étant qu'ils sont qualifiés de détergents doux, et donc non dénaturants. Le Tween 80 et le Tween 20 sont parmi les plus utilisés en laboratoire, mais aussi dans l'industrie agro-alimentaire. Le Tween 80 est depuis longtemps utilisé dans

la fabrication des glaces comme émulsifiant, évitant ainsi aux protéines du lait de précipiter avec la graisse, et rendant la glace plus crémeuse (Goff, 1997). Le CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) a publié en février 2020 un rapport montrant que le Tween 80 est présent comme excipient dans pas moins de 17 vaccins présents sur le marché américain (CDC, 2020).

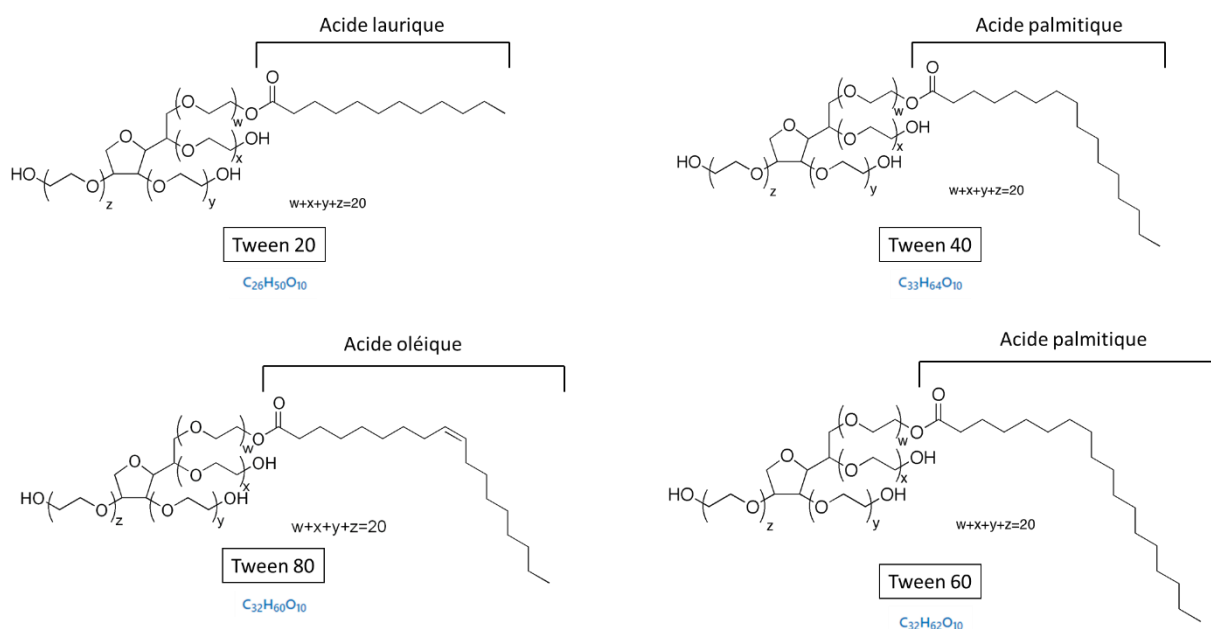


Figure 54 Structure des différents types de polysorbates, ou Tween.

La place des détergents dans notre étude

Il est à noter que le Tween 80 est ajouté à certains milieux de culture bactériens. Cela permet entre autres, de favoriser la croissance des bactéries par l'apport nécessaire d'acides gras (ester oléiques). Un rôle dans la facilitation de la dissociation des chaînes a aussi été suggéré. Initialement, le Tween permettait d'abaisser la tension superficielle du liquide afin de mieux répartir les bactéries pipetées sans utiliser de baguettes de verre (Persoone, 1966).

De façon quelque peu fortuite et involontaire, deux compositions différentes du milieu YEL, permettant de cultiver les *Propionibacterium*, ont été utilisées pour cette thèse : l'une sans Tween 80, l'autre contenant 0,1 % de ce détergent. Un effet majeur de ce dernier sur la chélation du Pb par ces bactéries a ainsi été détecté. S'en est suivi une série d'expériences pour tenter de décrypter par quel biais le Tween 80 permet d'augmenter ainsi les capacités des bactéries à capter le plomb.

Matériel et méthodes

I. Évaluation de la capacité de captation du Pb par les bactéries en présence de détergents

La même méthode que pour l'évaluation classique de la capacité de captation des métaux est utilisée. Pour rappel, les bactéries sont d'abord cultivées jusqu'à leur phase stationnaire de croissance. Du Tween 80 est ajouté au milieu de culture YEL pour les *Propionibacterium*, ou LB pour les *Escherichia coli*. Du MRS dépourvu de Tween 80 est utilisé pour la comparaison avec le MRS classique contenant 1 % de Tween 80. Après centrifugation et lavage, les bactéries sont toutes calibrées à une $DO_{600nm} = 2,5$ puis sont mises en contact du métal. Pour évaluer extemporanément l'effet des détergents, ils sont alors ajoutés aux concentrations données. Ils sont ainsi mis en contact durant toute la durée de l'exposition des bactéries aux métaux (1 h). Les culots bactériens sont ensuite lavés et les métaux sont quantifiés dans le dernier culot par ICP-MS selon la méthode décrite précédemment.

II. Expériences de « rasage » *shaving*

Le protocole de *shaving* des bactéries propioniques est réalisé par le laboratoire du Dr Jan, STLO – Rennes.

La souche de *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA129 est cultivée en phase stationnaire dans du milieu YEL avec ou sans Tween 80 0,1 %. Les bactéries sont ensuite centrifugées et lavées dans du PBS pH 8,5 contenant 5 mM de dithiothéitol (DTT). De la trypsine (V511, Promega, Madison, USA) à 0,2 g/L est diluée dans le même tampon, puis ajoutée à la suspension bactérienne. Cette étape de *shaving* est réalisée durant 1 h à 37 °C dans un volume final de 0,5 mL, contenant $5 \cdot 10^9$ bactéries pour 4 µg de trypsine en agitation (180 rpm). Les bactéries sont ensuite séparées du surnageant contenant les protéines digérées par centrifugation (8 000 xg, 10 min, 20 °C). Les bactéries dites « rasées », ayant subi le protocole de *shaving*, sont mises en contact de 25 ppm de Pb, avec ou non présence de Tween 80 0,1 %. Les échantillons sont mis en agitation rotative douce (12 rpm) à température ambiante ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). Ils sont ensuite centrifugés 10 min à 1 700 xg, 20 °C. Les surnageants sont éliminés, et les culots bactériens subissent deux lavages successifs avec de la solution de Ringer à pH 7. Le dernier surnageant est éliminé, et les culots conservés semi-secs à 4°C jusqu'au dosage des métaux par ICP-MS. La méthode de dosage subséquente est la même que pour les expériences classiques de chélation des métaux.

III. Expérimentation animale

Les expérimentations animales ont été réalisées lors de l'expérience HM2 (Chapitre 2), en parallèle des souches de *Lactobacillus* afin d'optimiser l'utilisation d'animaux et permettre de conserver les mêmes témoins négatifs (eau osmosée) et positifs (eau contaminée avec 70 ppm de Pb).

Résultats expérimentaux

I. La capacité de captation du Pb des *Propionibacterium* est décuplée en présence de Tween 80

Après la découverte de l'effet particulier du Tween 80 pour la chélation du Pb chez quelques souches de *Propionibacterium*, les 21 souches ont été cultivées en présence de 0,1 % de Tween 80. L'ajout de ce détergent augmente considérablement la chélation des bactéries vis-à-vis du Pb (Figure 55). Dans l'ensemble, les souches passent d'un pouvoir faiblement chélateur à de moyennes voire fortes chélations pour 6 et 14 souches, respectivement ; seule une souche (*P. freudenreichii* CIRM-BIA125) présente un pouvoir chélateur du Pb qui reste inférieure à 50 % en présence du détergent.

Les *Propionibacterium*, au même titre que les Bifidobactéries, les *Cutibacterium*, font partie du groupe des Actinobactéries. Pour cette raison, il était intéressant de regarder si cet effet positif du Tween 80 sur la chélation était vérifié chez d'autres genres bactériens de ce groupe. Quatre souches de *Cutibacterium* ainsi que 10 souches de *Bifidobacterium* ont été cultivées respectivement dans du YEL contenant 0,1 % de Tween 80, et dans du MRS cystéiné dépourvu de Tween (le MRS contenant normalement 0,1 % de Tween 80). Trois souches de *Cutibacterium* sur 4 semblent sensibles à l'ajout de Tween 80, passant de chélations basses à moyennes (Figure 55). Les *Bifidobacterium* ont également de meilleures chélations du Pb en présence du détergent (Figure 55). Les *Cutibacterium* et les *Bifidobacterium* étant déjà, lorsque le détergent n'est pas présent, de meilleures chélatrices que les *Propionibacterium*, la différence est donc moins marquée. Il est à noter qu'une souche de *Bifidobacterium* (*B. longum* FPL 19312) a présenté des captations faibles du Pb, que ce soit en présence ou en absence de Tween 80. Quelques souches ont été expérimentées en présence / absence de Tween 80 pour la captation du Cd et de l'Al également, mais aucun changement n'a été observé

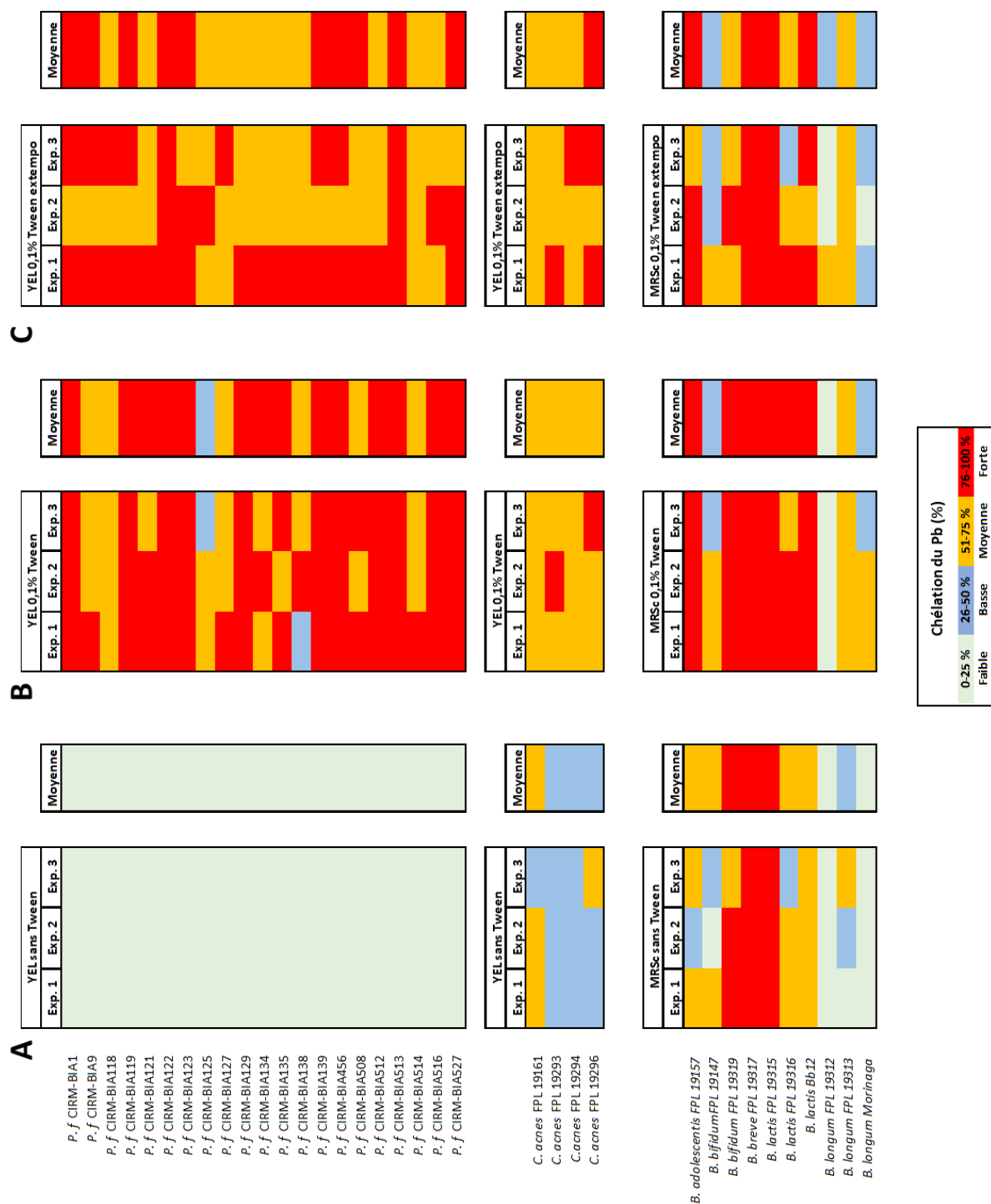


Figure 55 Effet de 0,1 % de Tween 80 sur la captation de 25 ppm de Pb par des Actinobactéries. (A) Captation du Pb sans Tween 80. (B) Captation du Pb avec 0,1 % de Tween 80 dans le milieu de culture. (C) Captation du Pb avec 0,1 % de Tween 80 extemporanément. Les capacités de chélation sont définies comme un pourcentage de la quantité initiale de métal en solution, réalisées en triplicats. Ces capacités sont codées par des couleurs comme faible (0-25 %), basse (26-50 %), moyenne (56-75 %) et forte (76-100 %).

(données non montrées). De même, afin de voir si cet effet était plus général, et était susceptible de s'appliquer à d'autres genres bactériens d'autres groupes, nous avons testé quelques souches de BL et d'Entérobactérales en présence / absence de Tween 80 (Figure 56). Les BL sont normalement cultivées dans du MRS, qui contient déjà du Tween 80 à 0,1 %. Elles ont donc été cultivées dans un milieu dépourvu de ce détergent : les captations du Pb restent sensiblement les mêmes, avec même une légère tendance à la hausse sans détergent mais qui n'est pas significative (Figure 56A). Du Tween 80 a également été ajouté au milieu LB qui permet de cultiver les *E. coli* et les *Serratia* spp. : à nouveau, aucune différence marquée dans la captation du Pb n'était observable (Figure 56B). L'effet *boost* du détergent semble donc se cantonner aux Actinobactéries, les *Propionibacterium* étant les plus sensibles car les moins chélatrices de base.

Afin de savoir si l'effet du Tween 80 persiste à de plus fortes concentrations en Pb, *P. freudenreichii* CIRM-BIA 129 (Figure 57A), *P. freudenreichii* CIRM-BIA 118 (Figure 57B) et *P. freudenreichii* CIRM-BIA 125 (Figure 57C) ont été éprouvées pour leur chélation de 12,5, 25 et 50 ppm de Pb(II). Pour la première, les chélations sont similaires et très proches de 100 % même à la plus forte concentration de 50 ppm (Figure 57A). Une baisse de chélation est observée pour les deux autres souches quand elles

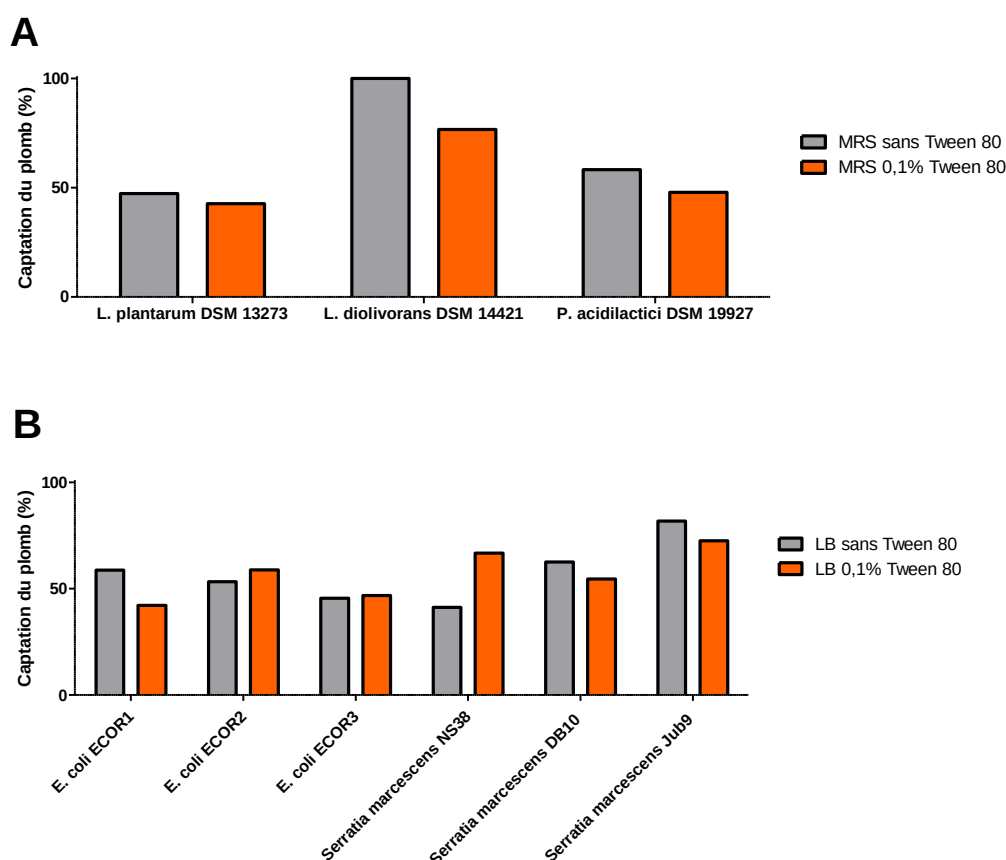


Figure 56 Effet du Tween 80 sur la captation de 25 ppm de Pb par des LAB (A) et des Entérobactérales (B). Le Tween 80 est présent ou absent dans le milieu de culture. Les capacités de chélation sont définies comme un pourcentage de la quantité initiale de métal en solution.

sont confrontées à 50 ppm de Pb(II) (Figure 57B et C). De même, pour tenter de voir les limites de concentrations en Tween 80 qui permettent d'induire une réponse au niveau des bactéries, ces trois mêmes souches ont été mises en contact de différentes concentrations en Tween 80. Lorsque *P. freudenreichii* CIRM-BIA 129 est cultivée avec deux fois moins ou deux fois plus de Tween 80, les chélation restent sensiblement les mêmes (Figure 57A). La chélation de cette souche étant proche de 100 % avec la concentration de 0,1 % de Tween, ce résultat était attendu pour la concentration de 0,2 %. En revanche, il est intéressant de voir que la diminution de la concentration en Tween 80 d'un facteur 2 n'affecte pas sa capacité à induire la captation du Pb chez cette souche. Une concentration de 0,005 % de Tween 80, soit 20 fois moins que la concentration « classique », a été testée sur les souches *P. freudenreichii* CIRM-BIA 118 (Figure 57B) et *P. freudenreichii* CIRM-BIA 125 (Figure 57C). Cette concentration en Tween diminue de moitié la chélation de *P. freudenreichii* CIRM-BIA 125 pour toutes les concentrations de Pb comparativement aux concentrations de 0,05 et 0,1 % (Figure 57C). En revanche, elle devient inefficace pour la souche *P. freudenreichii* CIRM-BIA 118, puisque cette dernière retrouve une chélation du Pb similaire au témoin (sans Tween) (Figure 57B). Cette concentration semble donc trop faible pour avoir un réel effet sur les bactéries.

II. L'effet du Tween 80 est valable extemporanément

Lors des premières expériences, le Tween 80 était ajouté au milieu de culture : les bactéries étaient donc très longtemps en contact avec le détergent, et se multipliaient en sa présence. L'ajout de Tween de façon extemporanée a été testée sur les souches *P. freudenreichii* CIRM-BIA 129 (Figure 58A) et *P. freudenreichii* CIRM-BIA 134 (Figure 58B) en présence de 25 ppm de Pb. Le détergent est alors ajouté en même temps que le métal, au moment du contact des bactéries avec ce dernier. Différentes concentrations en Tween 80 ont également été ajoutées au milieu ou à la solution de Ringer pendant la mise en contact. De façon globale, pour les 3 concentrations en Tween 80, le fait de l'ajouter extemporanément ne change rien à l'effet observé : la captation du Pb en présence du Tween, qu'il soit ajouté pendant la culture ou pendant toute la mise en contact semble avoir un effet similaire sur la captation du Pb. Ce phénomène est vérifié également plus généralement chez les *Propionibacterium*, *Bifidobacterium* et *Cutibacterium* (Figure 55) où la concentration de 0,1 % de Tween 80 a été testée pour toutes les souches de façon extemporanée.

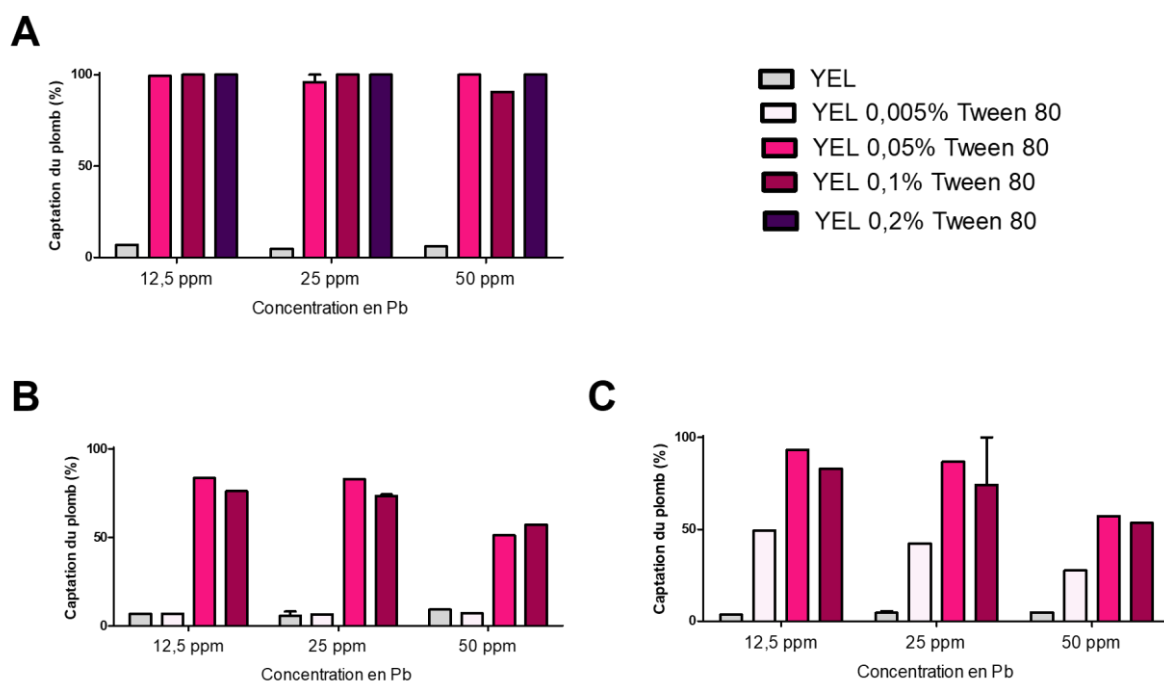


Figure 57 Effet de différentes concentrations de Tween 80 dans le milieu sur la captation de différentes concentrations en Pb. (A) *P. freudenreichii* CIRM-BIA129. (B) *P. freudenreichii* CIRM-BIA 118 et (C) *P. freudenreichii* ICRM-BIA125. Les capacités de chélation sont définies comme un pourcentage de la quantité initiale de métal en solution.

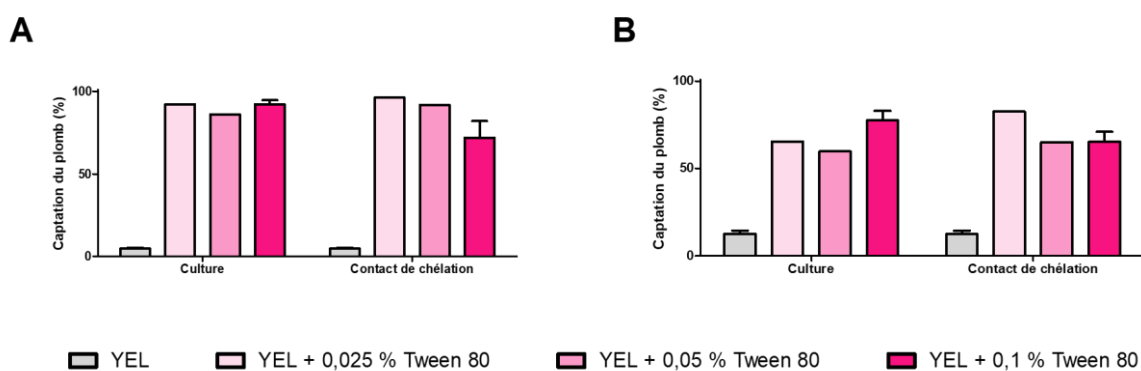


Figure 58 Effet du moment de la mise en contact avec le Tween 80 sur la captation du Pb. (A) *P. freudenreichii* CIRM-BIA129 et (B) *P. freudenreichii* CIRM-BIA134. Les capacités de chélation sont définies comme un pourcentage de la quantité initiale de métal en solution.

III. L'effet du Tween 80 est rapide, durable et généralisable à d'autres détergents

Pour plus de facilité, la souche *P. freudenreichii* CIRM-BIA129, qui est bien caractérisée par le laboratoire du STLO de Rennes, a été choisie pour la suite de l'exploration de l'effet du Tween 80.

Dans les expériences précédentes, il a été démontré que la concentration de 0,05 % de Tween 80 était suffisante pour induire une réponse au niveau des bactéries quant à la captation de 25 ppm de Pb(II), que ce soit dans le milieu de culture comme lorsqu'ajouté extemporanément. Dans le dernier cas, le Tween 80 était présent tout au long du contact des bactéries avec le plomb, soit durant l'heure entière d'incubation. Ce temps de contact a été raccourci à 5 minutes (Figure 59A). Pour cela, les bactéries ont été mises en contact du Tween 80 pendant 5 min, puis centrifugées et le surnageant remplacé par de la solution de Ringer contenant 25 ppm de Pb. Un effet intermédiaire est obtenu : avec une heure d'incubation, la captation du Pb avoisine les 100 %, alors qu'elle est de 60 % environ avec un contact de 5 minutes (Figure 59A). De la même façon, le Tween 80 a pu être lavé. A ce moment-là, les bactéries ont été mises en contact du Tween 80 pendant 1h à 5 min, le surnageant retiré et 6 lavages successifs avec 10 mL de solution de Ringer ont été effectués avant de mettre en contact les bactéries cette fois avec 25 ppm de Pb (Figure 59A). Dans les deux cas, le fait de laver les bactéries diminue légèrement la captation subséquente du Pb, mais l'effet *booster* du Tween est toujours bien présent. Cet effet est donc non seulement très rapide, mais aussi très robuste car il est peu altéré même après 6 lavages.

Le Tween 80 étant un détergent non-ionique, d'autres détergents de ce type (Tween 20, Triton X-100, NP40), anioniques (SDS), zwitterionique (CHAPS) ainsi que des sels biliaires (déoxycholate) ont été testés, afin de voir si ce *boost* pouvait être observé avec d'autres détergents / agents stressants (Figure 59B). Après 1h d'incubation, tous les détergents excepté le CHAPS induisent un effet potentialisateur de la chélation du Pb par la souche *P. freudenreichii* CIRM-BIA129. A nouveau, un effet intermédiaire est retrouvé pour tous les détergents avec seulement 5 minutes d'incubation, sauf pour le SDS qui a le même effet après 5 minutes et 1 heure de contact avec les bactéries (Figure 59B). Il est à noter que, comparativement au Tween 80, le Tween 20 a un effet beaucoup moins prononcé, alors que la seule chose qui les différencie est la queue aliphatique qu'ils portent. Des dosages des surnageants permettent de montrer qu'à nouveau, la fixation du Pb par les bactéries, même induite par les détergents, est robuste car la grande majorité du Pb non-chélaté se retrouve dans le premier surnageant (Figure 59C).

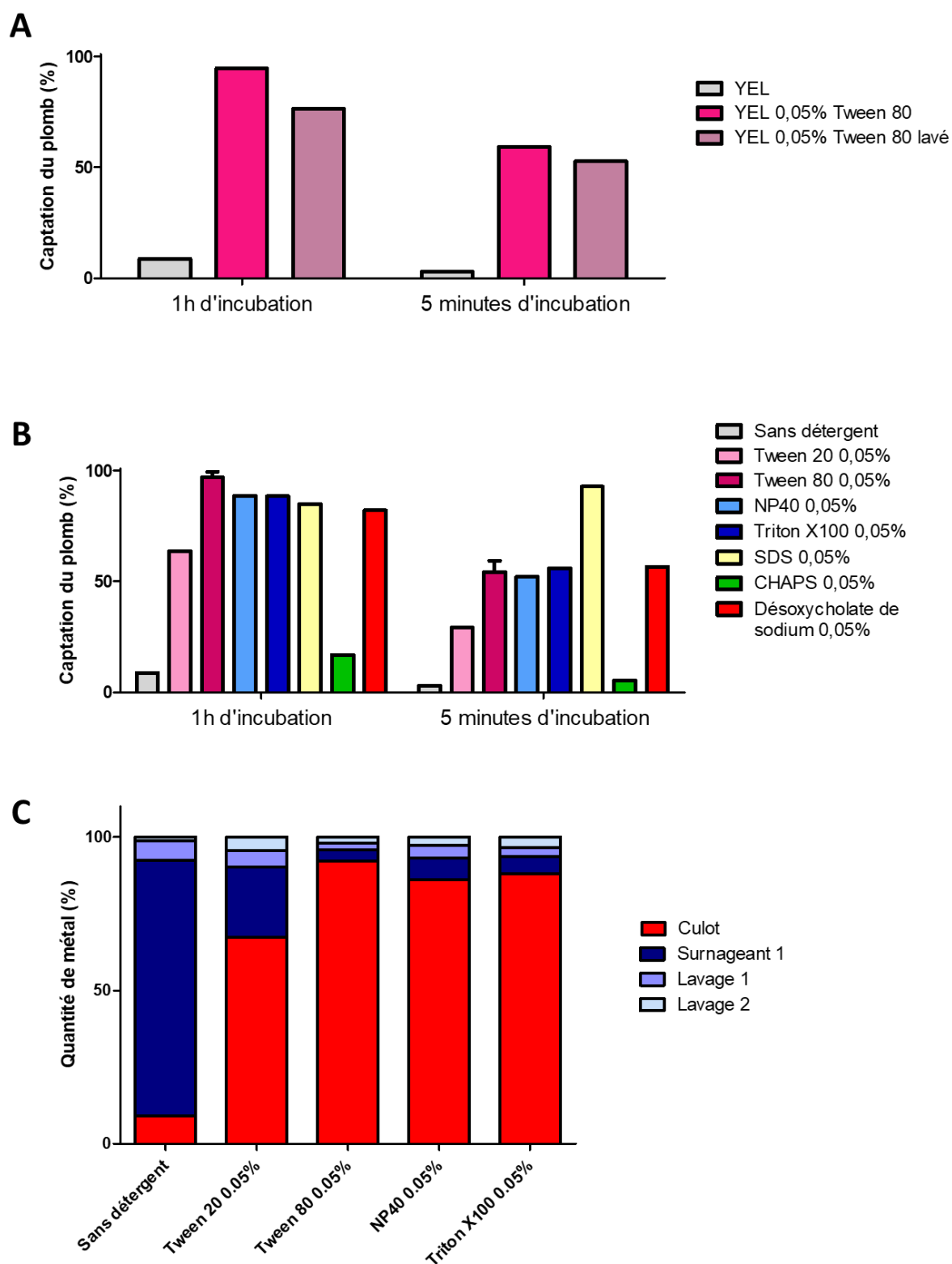


Figure 59 (A) Effet du temps de contact avec le Tween 80 et des lavages sur la captation du Pb par *P. freudenreichii* CIRM-BIA129. (B) Effet de différents détergents / agents stressants sur la captation du Pb par *P. freudenreichii* CIRM-BIA129. (C) Quantité de métal retrouvée dans le culot final, le surnageant puis les deux lavages successifs du culot.

IV. L'effet du Tween 80 modifie les propriétés de surface des bactéries

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées quant à l'effet du Tween 80, et des détergents plus généralement, sur la captation du Pb par les propionibactéries. Il pourrait avoir un effet de meilleure solubilisation du métal, ce qui le rendrait plus accessible aux bactéries. Cette hypothèse semble peu probable étant donné qu'aucune précipitation de métal n'est observée aux concentrations utilisées dans ce travail : le plomb semble bien soluble dans nos conditions physico-chimiques. Une autre hypothèse serait que le détergent agisse sur les bactéries, en induisant par exemple des gènes de stress qui pourraient permettre l'expression de protéines particulières permettant la chélation / l'internalisation des métaux. A nouveau, l'hypothèse semble incorrecte car le simple fait de mettre en contact les bactéries durant 5 minutes avec le détergent suffit à induire une captation du plomb de 50 % environ comparativement à un temps de contact d'une heure. L'induction de gènes, et l'expression de protéines qui plus est, est un processus normalement plus lent. Une dernière hypothèse serait que le détergent ait un effet direct sur la membrane bactérienne. Des mesures du potentiel zêta des bactéries montrent qu'en présence de Tween 80, elles acquièrent une électronegativité constante, peu importe le pH environnant, contrairement aux bactéries cultivées dans du milieu classique qui acquièrent cette électronegativité au fur et à mesure que le pH augmente (Tableau 10). Cette électronegativité peut venir de l'exposition du peptidoglycane : le Tween aurait un effet « nettoyant » de la surface des bactéries, et pourrait alors démasquer des sites de fixation du plomb, ici en l'occurrence.

Tableau 10 Mesures des potentiels Zêta des membranes de *P. freudenreichii* CIRM-BIA 129 cultivée dans du milieu YEL avec et sans Tween 80

	Potentiels Zêta				
	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
YEL	- 4,56	- 5,43	- 5,83	- 6,90	- 7,93
YEL + 0,1 % Tween 80	- 8,60	- 9,51	- 8,43	- 8,73	- 9,35

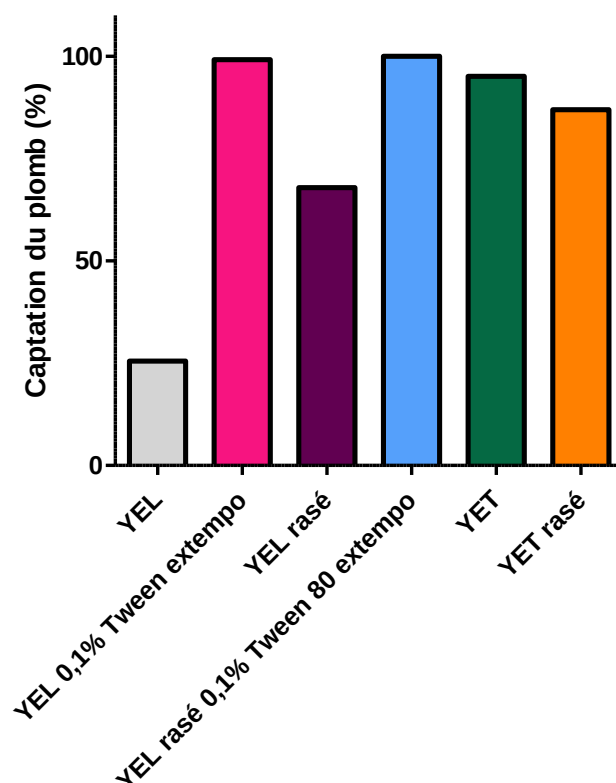


Figure 60 Effet du *shaving* sur la captation du Pb par *P. freudenreichii* CIRM-BIA129, en présence ou absence de Tween 80, sur des bactéries cultivées avec / sans détergent.

Pour tenter de démontrer cette hypothèse, plusieurs approches ont été utilisées. Tout d’abord, nous avons procédé, en collaboration avec le Dr Jan au STLO de Rennes, à une expérience de *shaving* des bactéries (Figure 60). Cette méthode a d’abord été élaborée pour identifier les protéines de surface, candidates potentielles pour de nouveaux vaccins notamment (Olaya-Abril *et al.*, 2014). Elle permet ainsi, par le biais d’un rasage chimique de la paroi bactérienne, de supprimer / séparer les protéines de surface tout en conservant les acides téichoïques et les lipotéichoïques mais aussi de conserver la viabilité de la bactérie. Des *P. freudenreichii* CIRM-BIA129 ont donc été cultivées soit en milieu YEL sans Tween 80 (YEL), soit en milieu YEL contenant 0,1 % de Tween 80 (YET). Ces deux culots bactériens ont été rasés chimiquement par la méthode de *shaving* (YEL rasé et YET rasé) en suivant le protocole cité dans l’article de Le Maréchal *et al.* (2015). Les bactéries de la condition YEL et YEL rasé ont ensuite été mises en contact de Tween 80 extemporanément, durant tout le temps de contact avec 25 ppm de Pb. On constate que le simple fait de raser les bactéries a un effet positif sur la captation du Pb, permettant d’atteindre près de 70 % de captation du Pb contre 25 % pour le témoin. Pour autant, les bactéries restent sensibles à l’effet du Tween 80 puisque lorsqu’elles sont mises en contact de 0,1 % de Tween 80 et de 25 ppm de Pb, on atteint 100 % de chélation comme lors de l’ajout de Tween 80 seul (Figure 60). Les bactéries ayant été cultivées avec du Tween 80 (YET) et qui sont rasées par la suite atteignent, elles aussi, presque 90 % de chélation du Pb. Le rasage des bactéries et l’exposition au Tween 80

semble avoir un effet similaire, et cumulatif : dans les deux cas, on peut imaginer démasquer des sites de fixation au plomb.

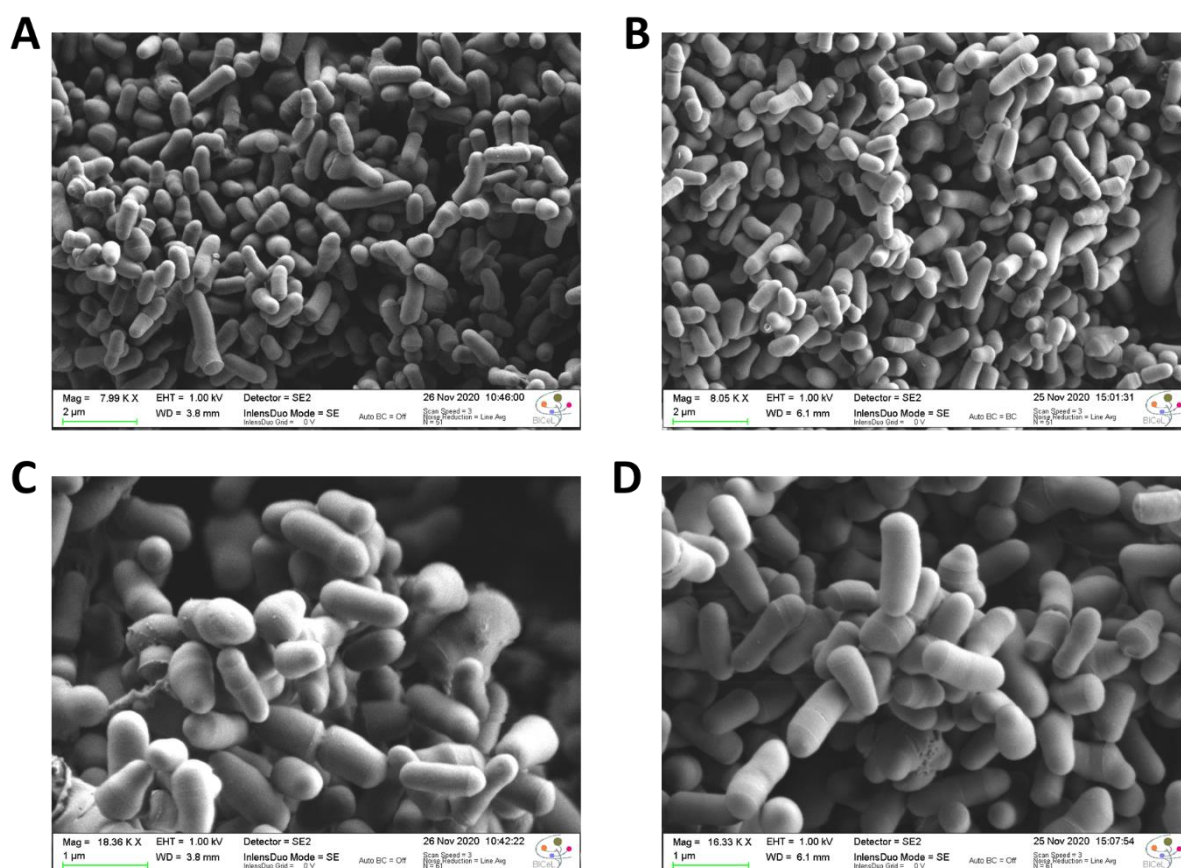


Figure 61 Images de MEB de *P. freudenreichii* cultivée sans Tween 80 (A et C), ou cultivées avec 0,1 % de Tween 80 et mises en contact de 25 ppm de Pb (B et D) à différents grossissements. Crédit photo : Nicolas Barrois, Plateforme BiCel, Institut Pasteur de Lille.

Afin d'aller plus loin dans la compréhension de ce mécanisme, de la microscopie à force atomique (AFM), électronique à balayage (MEB) et à transmission (MET) ont été envisagées en collaboration avec la plateforme BiCel de l'Institut Pasteur de Lille. Des *P. freudenreichii* CIRM-BIA129 ont été cultivées avec ou sans Tween 80 puis mises en contact de 25 ppm de Pb, puis analysées sur la plateforme BiCel en microscopie électronique à balayage (Figure 61). Seules les images de bactéries cultivées sans détergent (Figure 61A et C), ou avec détergent et mises en contact de 25 ppm de Pb (Figure 61B et D) sont montrées. Aucune différence d'aspect entre toutes les conditions n'a pu être observée. Les bactéries semblent avoir le même aspect, les mêmes arrangements et aucuns grains de Pb ne peuvent être observés à la surface des bactéries par cette technique. Des images réalisées en microscopie à force atomique (AFM) ne permettent pas non plus de distinguer les *Propionibacterium* entre les différentes conditions (Figure 62 et 63). Des images en AFM de *P.*

freudenreichii CIRM-BIA129 cultivée sans Tween 80 et n'ayant pas été mise en contact de Pb montrent des bactéries ayant une surface lisse (Figure 62). Des bactéries qui, au contraire, ont été cultivées dans du milieu YEL contenant 0,1 % de Tween 80 et mises en contact de Pb selon le protocole classique possèdent également une surface lisse (Figure 63). Les cultures ayant été divisée en deux, une partie destinée à la microscopie, l'autre étant destinée à des dosages, nous savons que les bactéries observées ici chélatent effectivement bien le plomb ; le manque de différence d'aspect des membranes n'est donc pas due à un soucis technique au moment de la chélation.

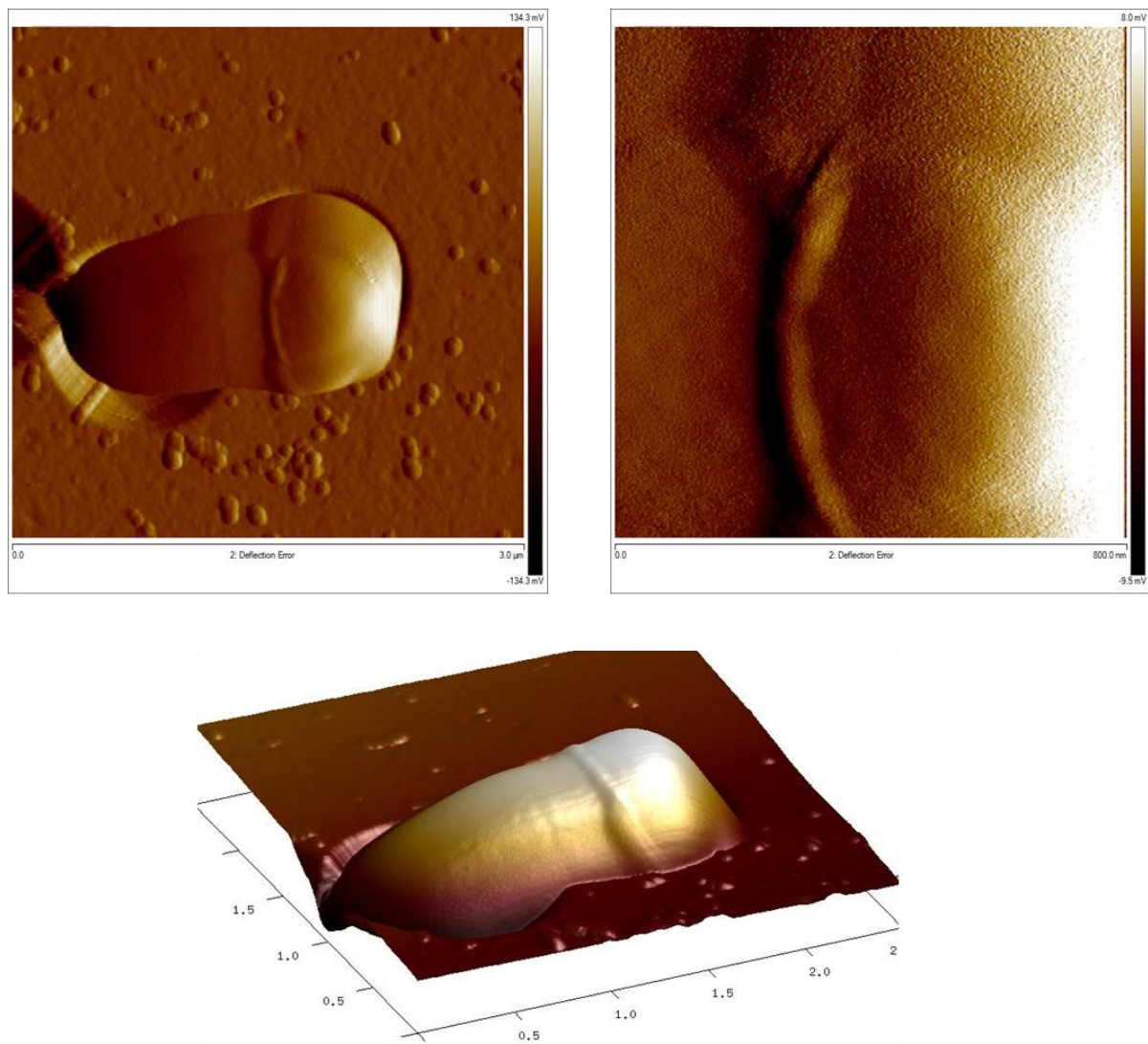


Figure 62 *P. freudenreichii* CIRM-BIA 129 cultivée dans du milieu YEL sans Tween 80 ni plomb, vu en AFM à différente échelle, et en représentation 3D. Crédit photo : Vincent Dupres, Plateforme BiCel, Institut Pasteur de Lille.

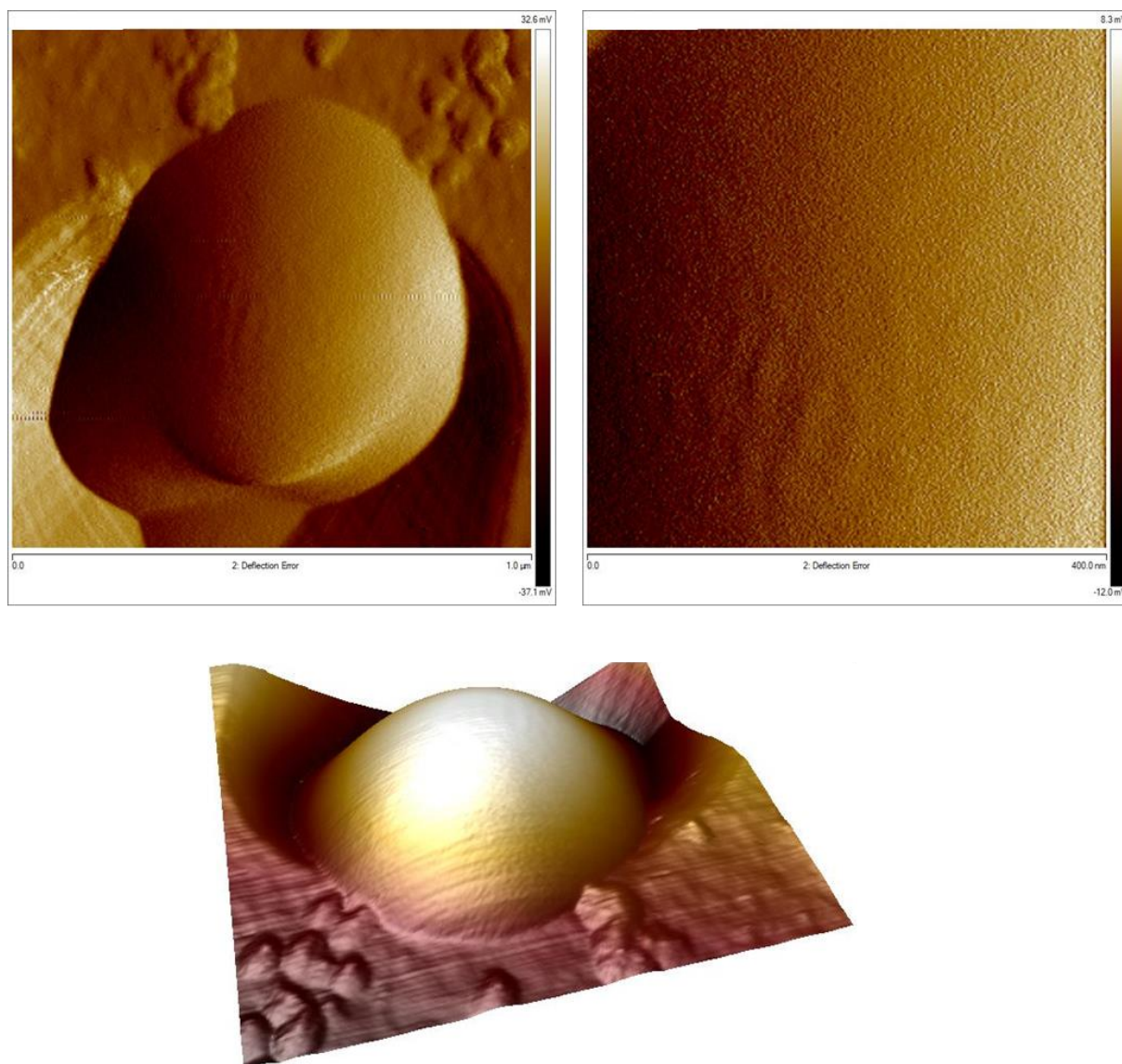


Figure 63 *P. freudenreichii* CIRM-BIA 129 cultivée dans du milieu YEL contenant 0,1 % de Tween 80, et mise en contact de 25 ppm de Pb, vue en AFM à différents grossissements et en représentation 3D. Crédit photo : Vincent Dupres, Plateforme BiCel, Institut Pasteur de Lille.

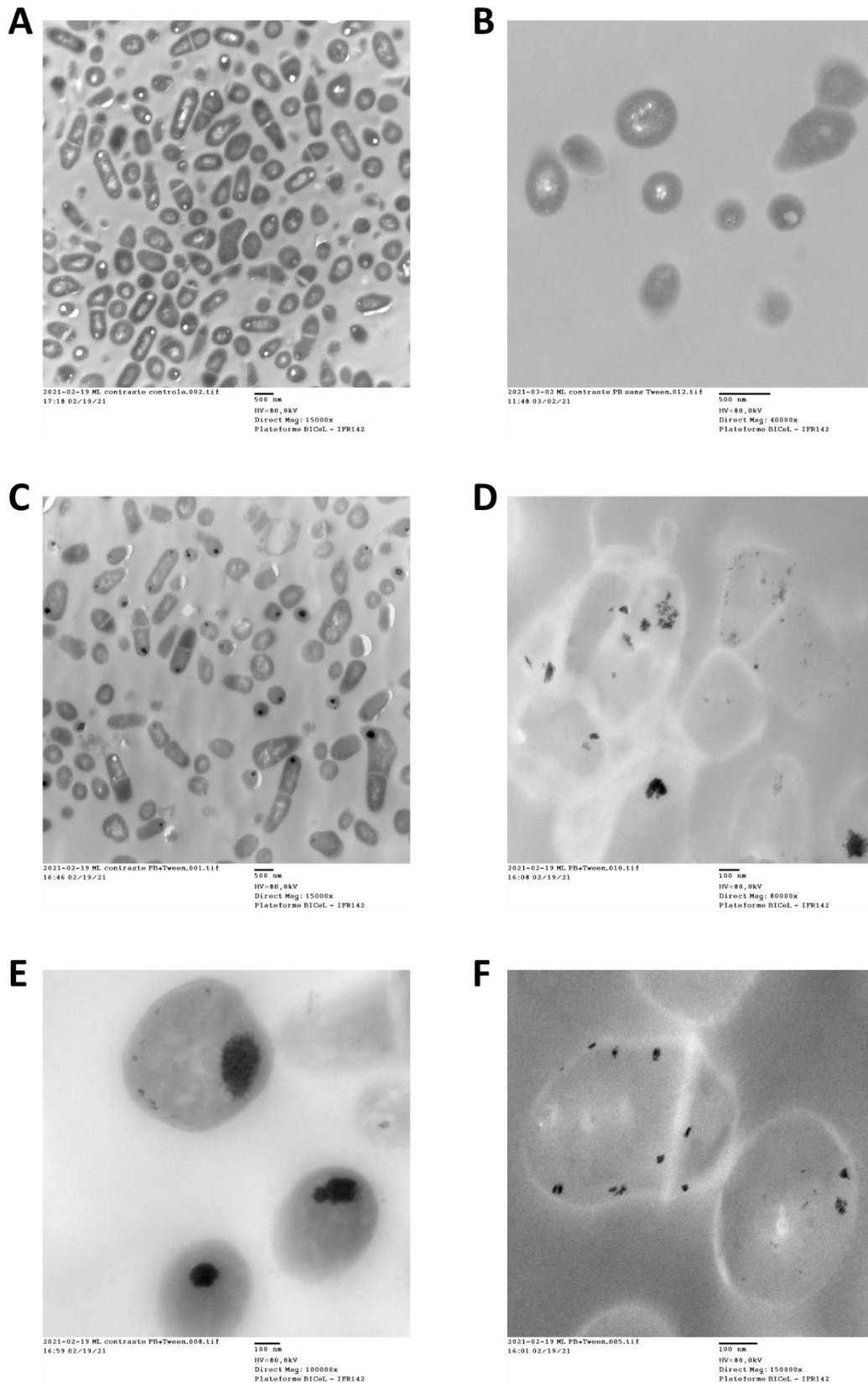


Figure 64 Observation de *P. freudenreichii* CIRM-BIA 129 en MET. (A – B) Bactéries cultivées sans Tween 80, et sans Pb, à différents grossissements. (C – F) Bactéries cultivées en présence de 0,1 % de Tween 80 et mises en contact de 25 ppm de Pb, à différents grossissements. Crédit photo : Nicolas Barrois, Plateforme BiCel, Institut Pasteur de Lille.

De la microscopie électronique à transmission a donc été envisagée (Figure 64), Haltunnen *et al.* (2008b) ayant déjà montré qu'il était possible de visualiser des grains de Pb à la surface de bactéries par cette technique. A nouveau, des bactéries cultivées avec et sans Tween, et mises en contact de 25 ppm de Pb ont été analysées par la plateforme BiCel. On voit, cette fois, très nettement apparaître des grains noirs à la surface de la majorité des bactéries lorsque ces dernières ont cultivé dans du milieu YEL + 0,1 % Tween 80 puis soumises à 25 ppm de Pb (Figure 64C - F). Ces grains de précipitation de Pb supposés sont visibles sur très peu de bactéries lorsque ces dernières ont été cultivées en absence de Tween 80 (Figure 64 A et B). La technique de MET permet donc de visualiser ce qui était observé dans les expériences de chélation : les *Propionibacterium* sont effectivement capables de capter plus de Pb lorsque ces dernières sont cultivées ou mises en présence de Tween 80, et cette captation semble se passer au niveau de la membrane. Ce qu'il est également intéressant de noter est que cette accumulation semble polarisée dans certains cas (Figure 64 D et E), formant de grosses accumulations de Pb à un endroit de la membrane, alors qu'elle est plus dispersée dans d'autres cas (Figure D et F).

V. Evaluation de l'efficacité *in vivo* de la chélation du Pb par des *Propionibacterium*

Forts de toutes ces observations, nous avons décidé de mettre en place des expériences animales afin d'évaluer *in vivo* si l'effet du Tween 80 pouvait améliorer la chélation du Pb par les *Propionibacterium*. Des souches de *P. freudenreichii* CIRM-BIA 129 cultivée dans du milieu YEL et cultivées dans du milieu YEL + 0,1 % de Tween 80 ont été ajoutées aux expériences HM1 et HM2 citées précédemment. Pour les raisons énoncées dans le chapitre 2, les données de l'expérience HM1 ne sont pas probantes, et donc non montrées ici. Ainsi, par souci de clarté du manuscrit, seuls les résultats concernant ces souches lors de l'expérience HM2 sont présentés dans cette partie du travail (Figure 65 et 66). Pour rappel, les données statistiques traduisent une significativité des données comparées aux données des souris témoins buvant de l'eau non-contaminée ($p < 0,05$: * ; $p < 0,01$: ** ; $p < 0,001$: ***). La plombémie (Figure 65 A) ainsi que la quantité de plomb dans le rein (Figure 65 B) et les fèces (Figure 65C) sont significativement différentes du témoin pour les souris ayant reçu la souche *P. freudenreichii* cultivée dans du milieu contenant du Tween 80, mais ne le sont pas de celles du témoin positif de souris buvant de l'eau contaminée en Pb. Cela signifie que l'apport de la bactérie aux souris n'empêche pas la diffusion du Pb dans la circulation, et donc son accumulation dans les organes. Pour les souris ayant reçu la souche de *P. freudenreichii* cultivée dans du milieu YEL classique, seule la concentration en Pb dans les fèces est significative par rapport aux souris témoins (Figure 65C). Pour autant, aucune

significativité n'est observée comparativement aux souris témoins buvant de l'eau contaminée, ni dans le sang, ni dans le rein, ni dans l'excrétion dans les fèces. De nouveau, cela signifie que la souche ne permet pas d'induire une diminution des quantités de plomb observées en comparaison des souris ne recevant pas de bactéries mais buvant de l'eau contaminée. Des dosages des métaux essentiels permettent de nouveau de s'assurer que l'apport de ces deux bactéries n'induit pas de changements majeurs dans la balance des métaux essentiels (Figure 66).

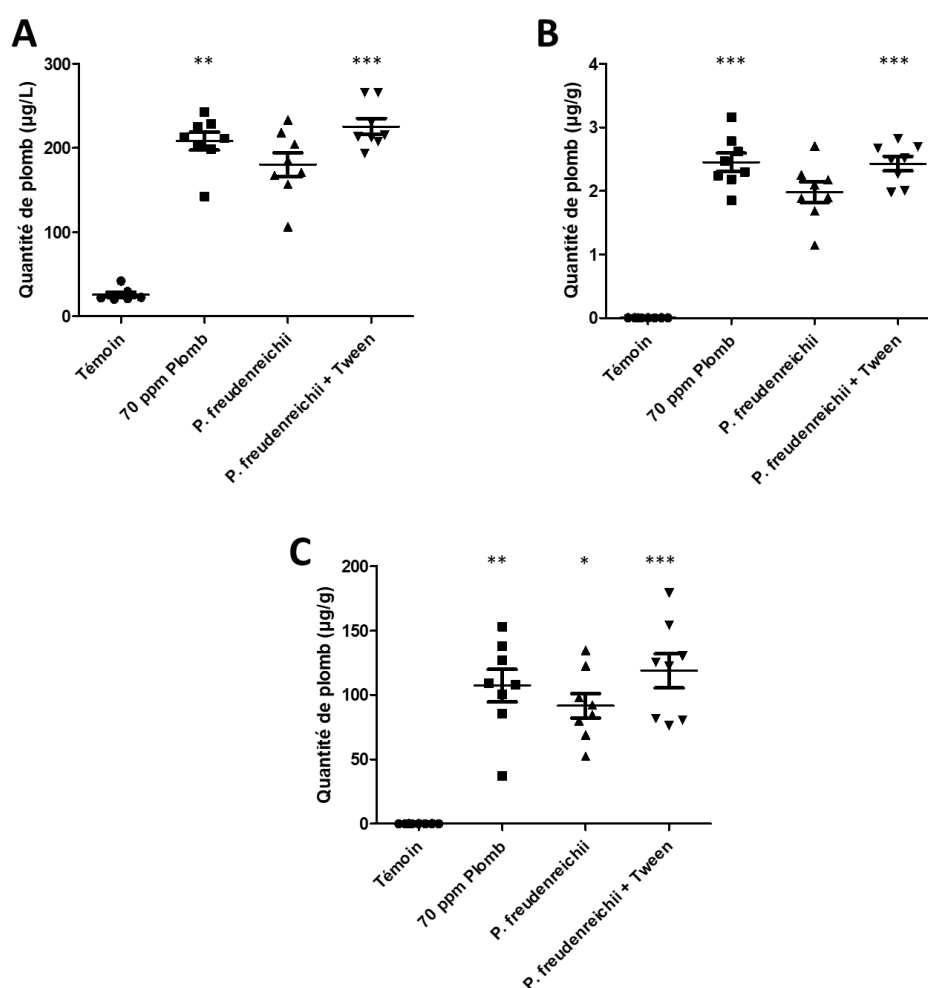


Figure 65 Quantités de plomb dans le sang (A), dans le rein (B) et les fèces (C) des souris HM2.

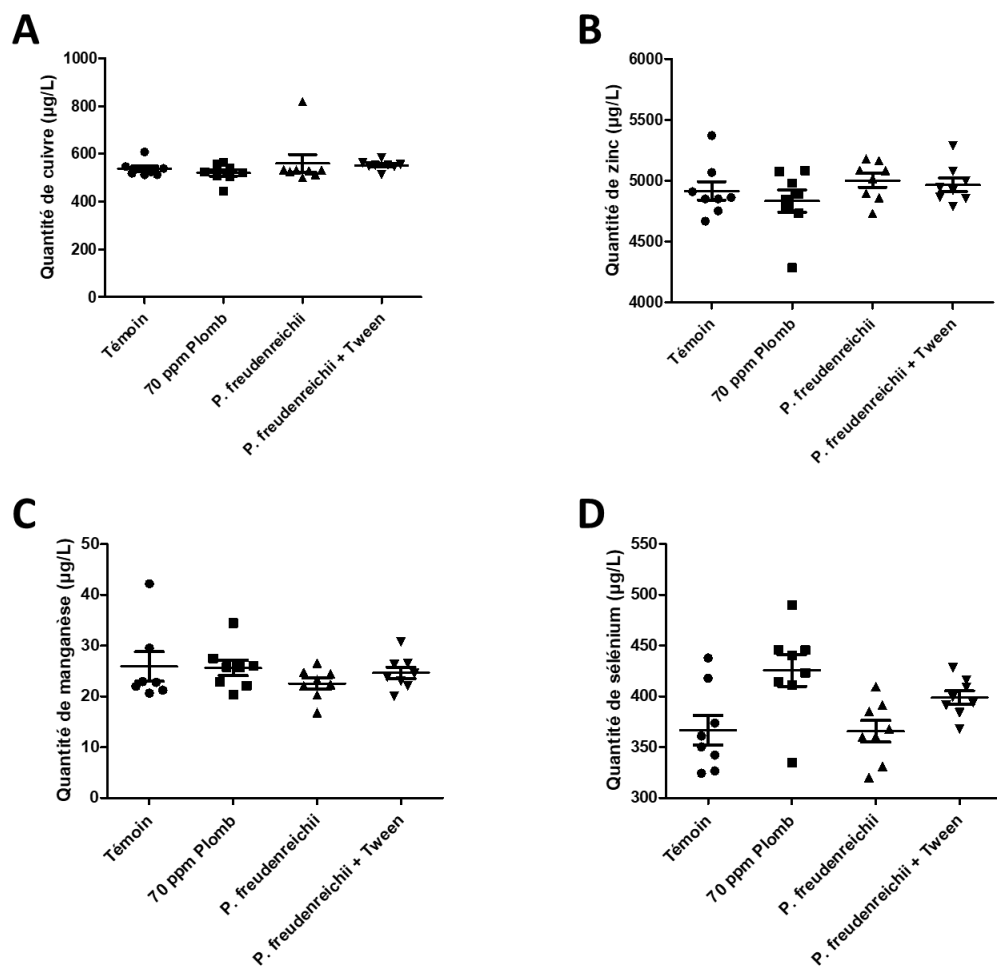


Figure 66 Concentration en cuivre (A), zinc (B), manganèse (C) et sélénium (D) dans le sang des souris HM2.

Conclusion

Dans cette dernière partie, nous avons cherché à comprendre l'effet du Tween 80 sur la captation du Pb par les bactéries. Partis d'une observation quelque peu fortuite, tout un travail exploratoire a été réalisé et mériterait d'être poursuivi. Nous avons démontré que le Tween 80 a un effet bénéfique sur la captation du Pb par les *Propionibacterium*, et plus largement, dans une moindre mesure, par quelques Actinobactéries. Pour réellement comprendre si l'effet est spécifique au groupe et non pas à quelques genres donnés, il peut être envisagé d'étudier d'autres genres d'Actinobactéries. Cet effet a pu non seulement être observé lorsque les bactéries sont cultivées dans du milieu contenant ce détergent, mais aussi lorsqu'elles sont au contact de ce dernier uniquement au moment de capter le plomb (extemporanément). L'effet est ainsi très rapide, puisque seulement 5 minutes de contact suffisent à induire environ 50 % de l'effet souhaité. Cela laisse penser que le Tween 80 agit de façon mécanique, probablement à la membrane directement, plutôt que par induction de la transcription / traduction de protéines ou de transporteurs spécifiques des métaux. Paul *et al.* (2012) ont montré que des bactéries qui ont été tuées par autoclavage ont des capacités de captation des métaux plus importantes que les bactéries vivantes. En 1997 déjà, Puranik et Paknikar montraient que les captations du Pb(II) et du Zn(II) sont également meilleures chez des *Streptovorticillium cinnamoneum* mortes comparativement aux cellules vivantes. Ce traitement thermique pourrait induire une destruction des membranes, exposant ainsi plus de sites de liaisons aux métaux. Quelques années plus tard, Puranik et Paknikar (1999) ont suggéré que ce traitement thermique diminue au contraire la captation du Pb(II) et du Zn(II) chez une souche de *Citrobacter*. Dans ce même article, les auteurs ont démontré qu'un traitement des bactéries avec 1 % de Triton X-100 double la captation du Cd(II), mais qu'il n'a aucun effet sur celles du Pb et du Zn. Nous savons que le Tween ne tue pas nos bactéries aux concentrations utilisées puisqu'il peut être ajouté dans le milieu de culture : il n'induit donc pas de destruction de la membrane. Le traitement par des détergents pourrait donc « nettoyer » la surface bactérienne, exposant ainsi tous les sites de fixation possibles aux ions métalliques. Ceci est cohérent avec les observations que nous avons pu faire lors des expériences de rasage des bactéries. Le fait de retirer entièrement les protéines présentes à la surface des bactéries pourraient démasquer des sites de liaisons aux ions métalliques. Nos expériences de microscopie électronique à transmission semblent également aller dans ce sens : l'observation massive de précipités noirs, très vraisemblablement des grains de plomb à la surface des bactéries traitées avec du Tween confirmerait que le Pb est stocké au niveau de la membrane des bactéries. Tout cela semble être cohérent dans son ensemble : le Tween modifie les propriétés de surface des *Propionibacterium*, la rendant plus électronégative et permettant une liaison plus importante avec les ions de Pb qui sont chargés positivement, expliquant également l'effet extrêmement rapide observé. Même si des pistes semblent nous emmener sur cette hypothèse,

il reste encore à démontrer précisément le mécanisme par lequel ce démasquage pourrait s'opérer, et si réellement c'est bien le peptidoglycane ou les acides téichoïques / lipotéichoïques qui interviennent alors dans la captation du Pb à la surface bactérienne.

Ces résultats encourageants nous ont poussé à aller plus loin et tenter d'éprouver les capacités des bactéries à capter le Pb *in vivo*, en les cultivant ou non en présence de Tween 80. L'effet sur la captation du Pb *in vitro* étant majeur, nous nous attendions à une différence entre les deux « types » de souches *in vivo* également. Tout en gardant en tête que les acides biliaires semblent également « activer » le pouvoir chélateur des *Propionibacterium*, et pourraient donc permettre aux bactéries n'ayant pas été cultivées en présence de Tween 80 de devenir aussi performantes pour la chélation du métal *in vivo*, lors du passage dans le tractus gastro-intestinal. Comme pour les expériences *in vivo* réalisées avec des souches classiques (Chapitre 2), les résultats obtenus montrent que les bactéries ne captent pas assez de métal pour induire une réelle différence de plombémie et de quantité de plomb stockée dans les organes. Les résultats entre les *Propionibacterium* sensibilisées au Tween 80 ou non donnent des résultats qui sont similaires. Ce qui est encourageant en revanche est que, dans les deux types d'expériences, la présence des *Lactobacillus* comme des *Propionibacterium* ne change pas les balances des métaux essentiels, ce qui était une inquiétude légitime puisque ce sont des ions chargés positivement également.

Discussion générale et perspectives du travail

Dans ce travail, plusieurs champs disciplinaires ont pu être mis à profit pour tenter de faire avancer la question de la bioremédiation *in vivo*. Les ETM représentent en 2021 un problème déterminant de santé publique. A l'heure où l'humanité tente de réduire l'exposition des humains (et des animaux ...) aux divers polluants, il devient urgent de trouver des solutions pour lutter contre la toxicité de ces contaminants. Rémanents et non-dégradables, ils s'accumulent dans la chaîne alimentaire sans qu'aucune solution ne soit assez efficace et peu coûteuse pour être mise en place à grande échelle. La bioremédiation *in vivo*, autrement dit directement dans l'organisme de l'individu exposé, est une solution qui semble attractive car elle permet de protéger l'un des derniers maillons de la chaîne de contamination. La bioremédiation des sols est l'une des techniques les plus utilisées pour leurs deux raisons énoncées précédemment, mais le temps de traitement est souvent très long. Elle présente en revanche l'avantage, par rapport à la bioremédiation *in vivo*, de limiter le problème à la source, puisqu'il est maintenant connu que la plupart des ETM retrouvés dans l'alimentation trouvent leurs sources dans les matières premières utilisées pour ces aliments qui ont été cultivées sur des sols contaminés. La bioremédiation *in vivo* reste une option qui mérite plus d'attention et de développement. C'est pourquoi dans ce travail nous avons recherché des micro-organismes potentiellement intéressants dans la lutte *in vivo* contre la toxicité des ETM.

Basée en premier lieu sur une synthèse de la bibliographie, notre méthode a très vite évolué vers un large criblage de plus de 200 souches bactériennes d'origines très diverses dont on distingue les origines alimentaire et intestinale. Cette collection nous a permis de mieux apprécier la réponse aux métaux des bactéries dans leur globalité, qu'elles soient Gram + ou Gram -, et ainsi de mettre clairement en évidence que la captation des métaux est une réponse très « souche-spécifique ». Au sein d'une même espèce, nous avons pu montrer que des différences de chélation très marquées peuvent être observées, et qu'au contraire parfois des souches d'une même espèce possédaient des capacités de chélation très similaires. Dans le cas des souches d'*Hafnia alvei*, nous avons également pu remarquer que l'origine de la souche change significativement la chélation du plomb, la souche d'origine intestinale étant deux fois plus chélatrice que les souches alimentaires. Il serait intéressant d'intégrer d'autres souches intestinales à la collection afin de vérifier si cette différence s'applique également. Malgré tout, aucune conclusion ne peut être tirée quant au pouvoir chélateur d'une souche en se basant sur l'analyse d'une autre souche, même de la même espèce ; à l'image des propriétés probiotiques que peuvent posséder les bactéries (Marteau, 2011). Ces différences sont probablement dues à l'arsenal de protéines présentes à la surface de la bactérie (Beveridge and Murray, 1980 ; Monachese *et al.*, 2012), ou sécrétées dans l'environnement par les bactéries comme les EPS par exemple (Gerbino *et al.*, 2011 ; Lin *et al.*, 2019). Les EPS, accompagnés de protéines, peuvent former des biofilms autour des bactéries, leur permettant de se protéger et ainsi de mieux résister à leur

environnement (Tremblay *et al.*, 2014). Il serait donc intéressant de voir si des bactéries productrices de biofilms sont capables d'accumuler des métaux dans ces derniers, les empêchant d'accéder aux bactéries. En revanche, la résistance intrinsèque des bactéries aux métaux ne semble pas être un critère discriminant quant à la chélation de ces derniers, de même que la viabilité. En effet, nos bactéries sont toutes résistantes aux concentrations que nous avons utilisé dans notre étude, alors que des différences marquées sont observées dans les chélations. Les bactéries sont toutes très résistantes au plomb, et beaucoup s'avèrent en fait être de bonnes chélatrices, tandis qu'elles résistent également bien au cadmium, mais que peu sont capables de chélater le métal. De plus, certaines bactéries ayant des résistances moyennes au cadmium s'avèrent être parmi les plus captatrices du métal. Discriminer et sélectionner des souches sur la base de leur résistance semble donc être un critère trop restrictif, éliminant potentiellement de bonnes candidates.

Les mécanismes impliqués dans la captation des métaux sont tellement divers que cela explique également de telles différences. Même si le schéma classiquement admis est qu'une première étape de biosorption à la membrane a lieu, puis qu'une internalisation est ensuite possible, ces deux étapes sont fortement dépendantes de la bactérie, et aux gènes qu'elle possède. La collection de LAB issues d'une étude antérieure (Sun *et al.*, 2004) est très bien caractérisée génétiquement. Il serait maintenant intéressant de réaliser une étude génomique afin de potentiellement identifier des gènes en communs parmi les souches fortement chélatrices de métaux. On pourrait imaginer de procéder à la mutation expérimentale de ces gènes pour tenter de diminuer la chélation des métaux, à l'image de ce qu'il se fait classiquement dans l'identification de gènes de facteurs de virulence ; et si les protéines pour lesquelles ces gènes codent sont connues, cela permettrait d'identifier des facteurs décisifs dans la chélation des métaux. Il serait intéressant de regarder également les éventuels plasmides que pourraient porter nos bactéries chélatrices. Une fois ces facteurs identifiés, il serait aisé de cribler des souches pour leur expression de ces facteurs, peu importe leur origine, voire de les faire exprimer / surexprimer par d'autres bactéries facilement manipulables génétiquement. Pour ces expérimentations, les *Escherichia coli* pourraient être des candidates intéressantes puisqu'elles sont de bonnes chélatrices de plomb et de cadmium (Jia *et al.*, 2020). Le seul inconvénient de ces souches comparativement aux BL est qu'elles ne possèdent pas, pour la plupart, de statut GRAS et imposent le respect de la législation des OGMs.

L'objectif ultime de notre étude est d'identifier des bactéries chélatrices de métaux dans le but de développer de nouveaux probiotiques permettant de lutter contre la toxicité des métaux directement au niveau intestinal. L'interconnexion qui existe entre la dysbiose et les ETM dans différentes pathologies et l'utilisation de probiotiques est extrêmement complexe (Duan *et al.*, 2020), et il faut prendre en compte cette complexité dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques

Tableau 11 Comparaison d'études *in vivo* pour l'évaluation des capacités de LAB à chélater le plomb.

Etude	Souche de souris	Apport du plomb	Durée du traitement
Notre étude	♀ BaLB/c	70 ppm PbCl ₂ max par gavage	6 jours
Tian <i>et al.</i> , 2012	♂ Kunming	1000 ppm PbAc dans l'eau de boisson	11 semaines
Li <i>et al.</i> , 2017	♀ BaLB/c	5000 ppm PbAc par gavage	15 jours
Zhai <i>et al.</i> , 2020	♂ C57BL/6	1830 ppm PbAc dans l'eau de boisson	8 semaines

innovantes et personnalisées (Bhattacharya, 2020). C'est pourquoi il est important de passer par l'expérimentation animale afin de mieux évaluer l'efficacité de nos candidats *in vivo*, mais aussi leur innocuité pour l'hôte qui les reçoit. L'apport de prébiotiques a déjà été montré comme délétère pour l'équilibre des métaux essentiels de l'organisme (Zhai *et al.*, 2019). C'est pourquoi nous nous sommes attachés à vérifier dans nos expériences animales que ces balances n'étaient pas affectées par l'apport de nos bactéries. Dans notre étude, aucune des concentrations en métaux essentiels analysées n'étaient différentes en présence de nos souches bactériennes, ce qui est rassurant pour la suite des expériences. En revanche, l'apport de nos bactéries dans les conditions que nous avons utilisées n'a pas permis de diminuer la quantité de plomb dans l'organisme des souris, que ce soit au niveau sanguin comme au niveau des organes. Les bactéries utilisées, *i.e.* des *Lactobacillus* et des *Propionibacterium*, sont pourtant connues pour être résistantes à l'acidité gastrique, et sont supposées arriver vivantes au niveau de l'intestin. Quand bien même ces dernières ne survivraient pas, des études montrent que des bactéries mortes sont tout aussi capables de chélater les métaux que des cellules vivantes (Puranik et Paknikar, 1997 ; Zhai *et al.*, 2013). Trois études *in vivo* ont déjà montré de bons résultats sur la captation du plomb (Tableau 11). Les méthodes utilisées sont très variées. Dans tous les cas, elles sont réalisées sur une durée bien plus élevée que celle que nous avons employée. Une plus longue durée de traitement et d'exposition serait intéressante à réaliser, permettant effectivement de mimer des expositions chroniques. L'effet *in vivo* des bactéries n'est peut-être pas aussi rapide qu'*in vitro*, et une durée plus longue pourrait également permettre de mettre en évidence une efficacité sur le long terme malgré tout. Une autre différence majeure est l'apport du plomb. Trois autres études utilisent des concentrations en plomb bien supérieures à celles que nous avons utilisées. Elles ne reflètent malheureusement pas la contamination courante des humains. L'utilisation de telles doses peuvent permettre de mettre en évidence des concepts, mais ne sont absolument pas représentatives d'une réelle contamination chronique. De plus, les auteurs des trois articles utilisent de l'acétate de plomb, tandis que nous utilisons du chlorure de plomb. Nous avons fait ce choix car l'acétate de plomb est

pro-inflammatoire et est utilisé pour induire des colites chez les rongeurs (Randhawa *et al.*, 2014). Nos expérimentations animales nécessitent malgré tous des améliorations, et l'un des premiers paramètres que nous pourrions changer est la durée de l'expérience. On peut également envisager de réaliser ce type d'expérience avec du cadmium, en sélectionnant les souches les plus chélatrices pour ce métal. Des études *in vivo* réalisées entre autres par les mêmes équipes que pour le plomb ont montré que cela fonctionnait également pour le cadmium (Zhai *et al.*, 2013 ; Zhai *et al.*, 2014 ; Ojekunle *et al.*, 2017). Bhattacharya a réalisé en 2020 une revue de la littérature des modèles pré-cliniques étudiant les probiotiques comme moyen de lutter contre la toxicité du cadmium. Cette toxicité passant par une augmentation de la perméabilité intestinale et l'induction d'un stress oxydatif, les *Lactobacillus* montrent de bons résultats en luttant contre ces deux effets.

Dans notre étude, les souches de type Entérobactérales sont également de bonnes chélatrices de plomb, et surtout parmi les plus chélatrices de cadmium. Il conviendrait donc de les tester *in vivo* également. Les souches de type *Bifidobacterium* n'ont pas encore été évaluées *in vivo* non plus. En plus d'être chélatrices de plomb et pour certaines de cadmium, elles possèdent des effets anti-inflammatoires qu'il serait intéressant de combiner. Par la suite, il pourrait également être intéressant de réaliser *in vivo* des cocktails de souches bactériennes. L'utilisation simultanée de souches performantes pour la chélation d'un métal pourrait démultiplier les effets bénéfiques. De même, il serait utile de réaliser des cocktails de métaux car nous sommes exposés à plusieurs contaminants de façon simultanée. Nous avons d'ores et déjà montré que la présence des autres métaux peut, ou pas, avoir un impact sur la chélation des autres ETM. En choisissant des souches très performantes pour chaque métal, et dont les capacités de fixation des métaux ne sont par ailleurs pas influencées par la présence des autres, nous pourrions réaliser des cocktails de souches pour lutter contre la toxicité des ETM en général. Il pourrait aussi être intéressant d'intégrer des bactéries dans des produits alimentaires fermentés, tels que des yaourts ou des fromages à l'image de l'étude de 2014 par Bisanz *et al.* Des modèles de digestion pourraient permettre de voir si ce type d'aliment fonctionne dans la lutte contre les ETM, à la fois en présence du probiotique mais aussi en présence d'autres aliments qui pourraient interférer avec le processus. Si l'utilisation de bactéries intégrées à des produits alimentaires n'est pas réalisable ou peu efficace, il est toujours possible de les donner telles quelles sous forme lyophilisées en gélules par exemple. A l'heure actuelle, une seule étude chez l'humain a permis de relier clairement l'administration d'un probiotique, sous la forme d'un yaourt, à une diminution des concentrations sanguines en arsenic, mercure et dans une moindre mesure en plomb (Bisanz *et al.*, 2014).

La lutte contre la toxicité de l'aluminium s'avère en revanche plus complexe. Non seulement les preuves de certains de ses effets toxiques, notamment à long terme, ne sont pas encore bien établies,

mais nous avons en plus montré que sa fixation par les bactéries semble plus labile. Il reste encore à déterminer pourquoi les bactéries ont tendance à davantage « relarguer » cet ion métallique comparativement aux autres ions. Ce relargage pourrait expliquer les faibles taux de chélation observés après 2 lavages.

Au cours de ce travail, une propriété intéressante du Tween 80, qui s'est avérée généralisable à d'autres détergents, a pu être découverte. En plus d'avoir un effet bénéfique sur la croissance des bactéries (Persoone, 1966), ces agents permettent d'induire la chélation du plomb chez les *Propionibacterium*. Initialement classées parmi les souches les moins chélatrices de Pb de notre collection, et les moins performantes parmi les Actinobactéries testées, elles deviennent très fortement chélatrices en présence de détergent. La plus grosse progression est observée pour la souche *P. freudenreichii* CIRM-BIA 129, passant en moyenne de 4,79 % à 92,32 %, soit un gain de 87,53 % en moyenne en présence de 0,1 % de Tween 80. Puranik et Paknikar (1999) ont identifié un effet similaire du Triton X-100 à 1 % sur la captation du cadmium par une Entérobactériale, une souche de *Citrobacter*. Des expériences réalisées sur des bactéries du genre *Lactobacillus* ainsi que des Entérobactériales également (*Escherichia* et *Serratia*) ont permis de mettre en évidence que cette capacité est spécifique des *Propionibacterium* dans notre cas. De même, la captation du Cd et de l'Al par les *Propionibacterium* ne semble pas améliorée en présence du Tween 80. Dans une moindre mesure, un effet est également observé chez les Actinobactéries en général, puisque des souches de *Bifidobacterium* et *Cutibacterium* sont également sensibles à la présence du Tween 80. Anciennement classées dans les *Propionibacterium*, nous nous attendions à ce que les *Cutibacterium* montrent un effet similaire à ces dernières. Etant déjà plus chélatrices sans détergent (47 % contre 10 % en moyenne pour les *Propionibacterium*), l'effet est moins impressionnant mais reste notable, avec un gain de 25 % de pouvoir chélateur en moyenne en présence de 0,1 % de Tween 80.

Nos expériences ont également montré que l'effet du Tween, détecté à 0,1 %, est valable à 0,05 %. Une concentration de 0,025 % semble fonctionner, mais nous considérons que la concentration de 0,05 % est la concentration minimale pour obtenir un effet certain ; la concentration de 0,1 % étant une concentration optimale puisque supérieure à la concentration minimale et n'affectant absolument pas la viabilité des bactéries. L'effet du Tween 80 est valable non seulement lors de la culture des bactéries dans un milieu qui en contient, mais aussi lorsqu'il est ajouté extemporanément. Dans un premier temps, il était ajouté tout au long du contact de la bactérie avec le métal, soit durant une heure. Mais nous avons également montré qu'un contact de simplement 5 minutes permettait d'induire un effet, certes à moitié de ce que l'on retrouve lors d'un contact d'une heure, mais cela

semble indiquer que le Tween 80 a un effet mécanique sur les bactéries. L'hypothèse qu'il stresse les bactéries afin d'induire la transcription / traduction de gènes de résistance aux stress est ainsi apparue peu probable.

Afin de mieux comprendre l'impact du Tween 80 sur les *Propionibacterium*, nous nous sommes concentrés sur une souche en particulier pour réaliser des expériences de compréhension du mécanisme. *P. freudenreichii* CIRM-BIA 129 étant la souche qui possède le plus fort taux de progression, mais étant aussi l'une des mieux caractérisées, nous nous sommes concentrés sur cette dernière. Des expériences de rasages et de mesures des potentiels zêta de la membrane de cette dernière, réalisées en collaboration avec le STLO de Rennes, ont permis de montrer que le détergent semble modifier les propriétés de la membrane de la bactérie. En effet, le simple fait de supprimer les protéines de surface de la bactérie par le biais du rasage chimique permet de doubler la captation du Pb. Ce qui semble corréluer avec les mesures de potentiels zêta de la membrane, qui est fortement électronégative pour les bactéries ayant été cultivées dans du YEL + 0,1 % Tween 80. Le Tween 80 étant un détergent non-ionique, l'hypothèse qu'il se dépose en une sorte de fine couche autour de la membrane ne colle pas avec les observations. Nous avons réalisé des expériences où une fois le contact avec le Tween 80 réalisé, nous rincions les bactéries, ce qui n'affectait pas l'effet du détergent : cela semble aller également dans le sens de démasquer un/des sites d'intérêt au niveau de la paroi, plutôt que de « l'enduire » de quelque chose. Il permettrait donc plutôt de « nettoyer » la surface et ainsi d'exposer de plus nombreux sites de fixation au plomb. Dans l'espoir de pouvoir visualiser cet effet sur la membrane, des images de microscopie ont été réalisées en collaboration avec l'Institut Pasteur de Lille. La microscopie électronique à balayage ainsi que la microscopie à force atomique de *P. freudenreichii* CIRM-BIA 129 ne montrent aucune différence apparente de la paroi des bactéries ayant été en contact ou non du Tween 80 : leurs surfaces semblent lisses, leurs arrangements semblent identiques. En revanche, la microscopie électronique à transmission nous permet de visualiser très nettement l'effet positif du Tween 80 sur la chélation du Pb : des grains noirs sur une grosse majorité des bactéries apparaissent en présence du détergent. Halttunen *et al.* (2008) ont utilisé cette technique également pour montrer la précipitation de grains de plomb à la surface de *B. longum* et *L. fermentum*.

Afin de voir si cet effet positif du Tween 80 sur la chélation des métaux pouvait améliorer la fixation du Pb par les bactéries *in vivo*, des expériences chez la souris ont été réalisées. Les souches de *Propionibacterium* cultivées avec et sans Tween 80 ont été testées en même temps que les souches de *Lactobacillus* issues du criblage de la première partie de ce travail. Les conditions expérimentales ne semblent pas optimales, même pour visualiser cet effet bénéfique du Tween 80. Une fois qu'elles seront mieux définies, il serait intéressant de tester à nouveau ces souches. Même si l'effet *in vivo*

n'est pas vérifié, le mécanisme par lequel certains détergents, et le Tween 80 en particulier améliorent largement la chélation du Pb par les *Propionibacterium* reste à l'heure actuelle inédit. D'un point de vue plus conceptuel, cela ouvre le champ des possibles dans les propriétés chélatrices des bactéries en général qui peuvent être grandement amplifiées (voire diminuées) selon les conditions du microenvironnement moléculaire ou d'éventuels prétraitements physico-chimiques qui restent à définir. Ce travail est donc appelé à se poursuivre par de multiples aspects et il s'agit davantage de faire des choix pour faire progresser les connaissances dans ce domaine et les perspectives de valorisation en Santé humaine et environnementale.

Bibliographie

A

- Adouard, N., Magne, L., Cattenoz, T., Guillemin, H., Foligné, B., Picque, D., & Bonnarme, P. (2016). Survival of cheese-ripening microorganisms in a dynamic simulator of the gastrointestinal tract. *Food Microbiology*, 53, 30-40.
- Ahlberg, S. H., Joutsjoki, V., & Korhonen, H. J. (2015). Potential of lactic acid bacteria in aflatoxin risk mitigation. *International Journal of Food Microbiology*, 207, 87-102.
- Aitlhadj, L., & Stürzenbaum, S. R. (2010). The use of FUDR can cause prolonged longevity in mutant nematodes. *Mechanisms of Ageing and Development*, 131(5), 364-365.
- Alard, J., Peucelle, V., Boutillier, D., Breton, J., Kuylle, S., Pot, B., Holowacz, S., & Grangette, C. (2018). New probiotic strains for inflammatory bowel disease management identified by combining *in vitro* and *in vivo* approaches. *Beneficial Microbes*, 9(2), 317-331.
- Alard, Jeanne, Lehrter, V., Rhimi, M., Mangin, I., Peucelle, V., Abraham, A.-L., Mariadassou, M., Maguin, E., Waligora-Dupriet, A.-J., Pot, B., Wolowczuk, I., & Grangette, C. (2016). Beneficial metabolic effects of selected probiotics on diet-induced obesity and insulin resistance in mice are associated with improvement of dysbiotic gut microbiota. *Environmental Microbiology*, 18(5), 1484-1497.
- Alfrey, A. C., LeGendre, G. R., & Kaehny, W. D. (1976). The Dialysis Encephalopathy Syndrome. *New England Journal of Medicine*, 294(4), 184-188.
- Alfvén, T., Järup, L., & Elinder, C.-G. (2002). Cadmium and lead in blood in relation to low bone mineral density and tubular proteinuria. *Environmental Health Perspectives*, 110(7), 699-702.
- Alkorta, I., & Garbisu, C. (2001). Phytoremediation of organic contaminants in soils. *Bioresource Technology*, 79(3), 273-276.
- Allam, M. F. (2016). Breast Cancer and Deodorants/Antiperspirants: A Systematic Review. *Central European Journal of Public Health*, 24(3), 245-247.
- Almeida, A., Mitchell, A. L., Boland, M., Forster, S. C., Gloor, G. B., Tarkowska, A., Lawley, T. D., & Finn, R. D. (2019). A new genomic blueprint of the human gut microbiota. *Nature*, 568(7753), 499-504.
- Al-Saleh, I., Shinwari, N., Mashhour, A., Mohamed, G., & Rabah, A. (2010). Heavy metals (lead, cadmium and mercury) in maternal, cord blood and placenta of healthy women. *International journal of hygiene and environmental health*, 214, 79-101.
- Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D., & Kuipers, O. P. (2016). Bacteriocins of lactic acid bacteria: Extending the family. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 2939-2951.
- Anses (Agence nationale de sécurité sanitaire alimentation, environnement, travail. (2011). Etude de l'alimentation totale française 2 (EAT 2) Tome 1—Contaminant inorganiques, minéraux, polluants organiques persistants, mycotoxines, phyto-estrogènes. *Maison-Alfort : Anses*.
- Anses (Agence nationale de sécurité sanitaire alimentation, environnement, travail). (2013). *Expositions au plomb : Effets sur la santé associés à des plombémies inférieures à 100 µg/L*.

Anses (Agence nationale de sécurité sanitaire alimentation, environnement, travail). (2019). *Les valeurs limites biologiques pour les agents chimiques en milieu professionnel* | Anses—Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.

ANSM (Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé). (2011). *Évaluation du risque lié à l'utilisation de l'aluminium dans les produits cosmétiques*.

ANSM (Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé). (2018). *Résumé des Caractéristiques du Produit Belkya 10 mg/mL*.

Armougom, F., Henry, M., Viallettes, B., Raccach, D., & Raoult, D. (2009). Monitoring bacterial community of Human gut microbiota reveals an increase in *Lactobacillus* in obese patients and methanogens in anorexic patients. *PLoS ONE*, 4(9).

Arnich, N., Sirot, V., Rivière, G., Jean, J., Noël, L., Guérin, T., & Leblanc, J.-C. (2012). Dietary exposure to trace elements and health risk assessment in the 2nd French Total Diet Study. *Food and Chemical Toxicology*, 50(7), 2432-2449.

Assefa, S., & Köhler, G. (2020). Intestinal microbiome and metal toxicity. *Current opinion in toxicology*, 19, 21-27.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). (2012). Toxicological profile for cadmium. *U.S. Department of Health and Human Services*.

B

Babich, H., Stotzky, G., & Ehrlich, H. L. (1980). Environmental factors that influence the toxicity of heavy metal and gaseous pollutants to microorganisms. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, 8(2), 99-145.

Bagga, D., Reichert, J. L., Koschutnig, K., Aigner, C. S., Holzer, P., Koskinen, K., Moissl-Eichinger, C., & Schöpf, V. (2018). Probiotics drive gut microbiome triggering emotional brain signatures. *Gut Microbes*, 9(6), 486-496.

Bakshi, S., Banik, C., & He, Z. (2018). The impact of heavy metal contamination on soil health (p. 63-95).

Bellinger, D. C. (2008). Very low lead exposures and children's neurodevelopment. *Current Opinion in Pediatrics*, 20(2), 172-177.

Beveridge, T. J., & Murray, R. G. (1980). Sites of metal deposition in the cell wall of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 141(2), 876-887.

Bhakta, J. N., Ohnishi, K., Munekage, Y., Iwasaki, K., & Wei, M. Q. (2012). Characterization of lactic acid bacteria-based probiotics as potential heavy metal sorbents. *Journal of Applied Microbiology*, 112(6), 1193-1206.

Bhattacharya, S. (2020). The role of probiotics in the amelioration of cadmium toxicity. *Biological Trace Element Research*, 197(2), 440-444.

- Bindels, L. B., Neyrinck, A. M., Claus, S. P., Le Roy, C. I., Grangette, C., Pot, B., Martinez, I., Walter, J., Cani, P. D., & Delzenne, N. M. (2016). Synbiotic approach restores intestinal homeostasis and prolongs survival in leukaemic mice with cachexia. *The ISME Journal*, 10(6), 1456-1470.
- Bisanz, J. E., Enos, M. K., Mwanga, J. R., Chagalucha, J., Burton, J. P., Gloor, G. B., & Reid, G. (2014). Randomized open-label pilot study of the influence of probiotics and the gut microbiome on toxic metal levels in Tanzanian Pregnant Women and School Children. *mBio*, 5(5).
- Booik, C. C. G. M., El-Aidy, S., Rajilić-Stojanović, M., Heilig, H. G. H. J., Troost, F. J., Smidt, H., Kleerebezem, M., Vos, W. M. D., & Zoetendal, E. G. (2010). High temporal and inter-individual variation detected in the human ileal microbiota. *Environmental Microbiology*, 12(12), 3213-3227.
- Borges, S., Silva, J., & Teixeira, P. (2014). The role of lactobacilli and probiotics in maintaining vaginal health. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 289(3), 479-489.
- Bouglé, D., Roland, N., Lebeurrier, F. (1999). Effect of Propionibacteria supplementation on fecal Bifidobacteria and segmental colonic transit time in healthy human subjects. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 34(2), 144-148.
- Breton, J., Daniel, C., Dewulf, J., Pothion, S., Froux, N., Sauty, M., Thomas, P., Pot, B., & Foligné, B. (2013). Gut microbiota limits heavy metals burden caused by chronic oral exposure. *Toxicology Letters*, 222(2), 132-138.
- Breton, J., Daniel, C., Vignal, C., Body-Malapel, M., Garat, A., Plé, C., & Foligné, B. (2016). Does oral exposure to cadmium and lead mediate susceptibility to colitis? The dark-and-bright sides of heavy metals in gut ecology. *Scientific Reports*, 6.
- Breton, J., Massart, S., Vandamme, P., De Brandt, E., Pot, B., & Foligné, B. (2013). Ecotoxicology inside the gut: Impact of heavy metals on the mouse microbiome. *BMC Pharmacology & Toxicology*, 14, 62.
- Buchet, J. P., Lauwerys, R., Roels, H., Bernard, A., Bruaux, P., Claeys, F., Ducoffre, G., de Plaen, P., Staessen, J., & Amery, A. (1990). Renal effects of cadmium body burden of the general population. *Lancet (London, England)*, 336(8717), 699-702.
- Burrell, S.-A. M., & Exley, C. (2010). There is (still) too much aluminium in infant formulas. *BMC Pediatrics*, 10, 63.

C

- Campeotto, F., Waligora-Dupriet, A.-J., Doucet-Populaire, F., Kalach, N., Dupont, C., Butel, M.-J. (2007). Mise en place de la flore intestinale du nouveau-né. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, 31(5), 533-542.
- Carding, S., Verbeke, K., Vipond, D. T., Corfe, B. M., Owen, L. J. (2015). Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 26.
- Cascales, E., Buchanan, S. K., Duché, D., Kleanthous, C., Lloubès, R., Postle, K., Riley, M., Slatin, S., Cavard, D. (2007). Colicin biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 71(1), 158-229.

Centers for Disease Control and Prevention. (2020). Excipients Included in U.S. Vaccines.

Chekroun, K., Baghour, M. (2013). The role of algae in phytoremediation of heavy metals: A review. *J. Mater. Environ. Sci.*, 4, 873-880.

Cole, R. D., Anderson, G. L., Williams, P. L. (2004). The nematode *Caenorhabditis elegans* as a model of organophosphate-induced mammalian neurotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 194(3), 248-256.

Collado, M. C., Meriluoto, J., Salminen, S. (2007). Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus. *Letters in Applied Microbiology*, 45(4), 454-460.

Conseil des Communautés Européennes. (1980). Directive du Conseil du 15 juillet 1980 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine. *Journal officiel des Communautés européennes*.

Corr, S. C., Li, Y., Riedel, C. U., O'Toole, P. W., Hill, C., Gahan, C. G. M. (2007). Bacteriocin production as a mechanism for the anti-infective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(18), 7617-7621.

Cotter, P. D., O'Connor, P. M., Draper, L. A., Lawton, E. M., Deegan, L. H., Hill, C., Ross, R. P. (2005). Posttranslational conversion of l-serines to d-alanines is vital for optimal production and activity of the antibiotic lactacin 3147. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(51), 18584-18589.

Cross, M. L., Ganner, A., Teiblab, D., Fray, L. M. (2004). Patterns of cytokine induction by gram-positive and gram-negative probiotic bacteria. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 42(2), 173-180.

D

Daillère, R., Vétizou, M., Waldschmitt, N., Yamazaki, T., Isnard, C., Poirier-Colame, V., Duong, C. P. M., Flament, C., Lepage, P., Roberti, M. P., Routy, B., Jacquilot, N., Apetoh, L., Becharef, S., Rusakiewicz, S., Langella, P., Sokol, H., Kroemer, G., Enot, D., Zitvogel, L. (2016). *Enterococcus hirae* and *Barnesiella intestinihominis* facilitate cyclophosphamide-induced therapeutic immunomodulatory effects. *Immunity*, 45(4), 931-943.

Daisley, B. A., Monachese, M., Trinder, M., Bisanz, J. E., Chmiel, J. A., Burton, J. P., Reid, G. (2018). Immobilization of cadmium and lead by *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 mitigates apical-to-basolateral heavy metal translocation in a Caco-2 model of the intestinal epithelium. *Gut Microbes*, 10(3), 321-333.

Das, N., Vimala, R., & Karthika, P. (2008). Biosorption of heavy metals—An overview. *IJB T Vol.7(2) [April 2008]*.

De Caluwé, J.-P. (2009). Intoxication saturnine provoquée par l'usage prolongé de khôl, une cause sous-estimée dans les pays francophones. *Journal Français d'Ophtalmologie*, 32(7), 459-463.

Debiais, F. (2020). Conséquences osseuses de la grossesse et de l'allaitement. *Revue du Rhumatisme monographies*.

Deutsch, S.-M., Mariadassou, M., Nicolas, P., Parayre, S., Le Guellec, R., Chuat, V., Peton, V., Le Maréchal, C., Burati, J., Loux, V., Briard-Bion, V., Jardin, J., Plé, C., Foligné, B., Jan, G., Falentin, H. (2017).

Identification of proteins involved in the anti-inflammatory properties of *Propionibacterium freudenreichii* by means of a multi-strain study. *Scientific Reports*, 7.

Dherbécourt, J., Falentin, H., Jardin, J., Maillard, M.-B., Baglinière, F., Barloy-Hubler, F., Thierry, A. (2010). Identification of a secreted lipolytic esterase in *Propionibacterium freudenreichii*, a ripening process bacterium involved in Emmental cheese lipolysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(4), 1181-1188.

Diep, P., Mahadevan, R., Yakunin, A. F. (2018). Heavy metal removal by bioaccumulation using genetically engineered microorganisms. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6.

Djurasevic, S., Jama, A., Jasnic, N., Vujovic, P., Jovanovic, M., Mitic-Culafic, D., Knezevic-Vukcevic, J., Cakic-Milosevic, M., Ilijevic, K., & Djordjevic, J. (2016). The protective effects of probiotic bacteria on cadmium toxicity in rats. *Journal of Medicinal Food*, 20(2), 189-196.

Dominguez-Bello, M. G., Costello, E. K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., & Knight, R. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(26), 11971-11975.

Drissi, F., Merhej, V., Angelakis, E., El Kaoutari, A., Carrière, F., Henrissat, B., & Raoult, D. (2014). Comparative genomics analysis of *Lactobacillus* species associated with weight gain or weight protection. *Nutrition & diabetes*, 4, e109.

E

Eckburg, P., Bik, E., Bernstein, C., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S., Nelson, K., & Relman, D. (2005). Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science (New York, N.Y.)*, 308, 1635-1638.

Edwardson, J. A., Candy, J. M., Ince, P. G., McArthur, F. K., Morris, C. M., Oakley, A. E., Taylor, G. A., & Bjertness, E. (1992). Aluminium accumulation, beta-amyloid deposition and neurofibrillary changes in the central nervous system. *Ciba Foundation Symposium*, 169, 165-179; discussion 179-185.

EFSA. (2008). Safety of aluminium from dietary intake—Scientific Opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Food Contact Materials (AFC). *EFSA Journal*, 6(7), 754.

EFSA. (2011). Statement of EFSA on the Evaluation of a new study related to the bioavailability of aluminium in food. *EFSA Journal*, 9(5), 2157.

EFSA. (2012a). Cadmium dietary exposure in the European population. *EFSA Journal*, 10(1), 2551.

EFSA. (2012b). Lead dietary exposure in the European population. *EFSA Journal*, 10(7), 2831.

Egerton, S., Culloty, S., Whooley, J., Stanton, C., & Ross, R. P. (2018). The Gut Microbiota of Marine Fish. *Frontiers in Microbiology*, 9.

Ejtahed, H. S., Mohtadi-Nia, J., Homayouni-Rad, A., Niafar, M., Asghari-Jafarabadi, M., & Mofid, V. (2012). Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetic patients. *Nutrition*, 28(5), 539-543.

- El-Nezami, H., Kankaanpää, P., Salminen, S., & Ahokas, J. (1998). Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B1. *Food and Chemical Toxicology*, 36(4), 321-326.
- El-Nezami, Hani, Mykkänen, H., Kankaanpää, P., Suomalainen, T., Salminen, S., & Ahokas, J. (2000). Ability of a mixture of *Lactobacillus* and *Propionibacterium* to influence the faecal aflatoxin content in healthy Egyptian volunteers: A pilot clinical study. *Bioscience and Microflora*, 19, 41-45.
- Esquerre, N., Basso, L., Dubuquoy, C., Djouina, M., Chappard, D., Blanpied, C., Desreumaux, P., Vergnolle, N., Vignal, C., & Body-Malapel, M. (2018). Aluminum ingestion promotes colorectal hypersensitivity in rodents. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 7(1), 185-196.

f

- FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, & World Health Organization. (2011). Evaluation of certain food additives and contaminants: Seventy-third report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. World Health Organization.
- Félix, M.-A., & Braendle, C. (2010). The natural history of *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology*, 20(22), R965-R969.
- Fhoula, I., Najjari, A., Turki, Y., Jaballah, S., Boudabous, A., & Ouzari, H. I. (2013). Diversity and antimicrobial properties of Lactic Acid Bacteria isolated from rhizosphere of olive trees and desert truffles of Tunisia. *BioMed research international*, 2013, 405708.
- Filannino, P., Di Cagno, R., & Gobbetti, M. (2018). Metabolic and functional paths of lactic acid bacteria in plant foods: Get out of the labyrinth. *Current Opinion in Biotechnology*, 49, 64-72.
- Filella, M., Martignier, A., Turner, A. (2020). Kohl containing lead (and other toxic elements) is widely available in Europe. *Environmental Research*, 187, 109658.
- Finegold, S. M., Sutter, V. L., Mathisen, G. E. (1983). Normal indigenous intestinal flora. *Hentges DJ (Ed) Human Intestinal Microflora in Health and Disease*, 3-31.
- Foligné, B., Breton, J., Mater, D., & Jan, G. (2013). Tracking the microbiome functionality: Focus on *Propionibacterium* species. *Gut*, 62(8), 1227-1228.
- Foligné, B., Dewulf, J., Breton, J., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., & Pot, B. (2010). Probiotic properties of non-conventional lactic acid bacteria: Immunomodulation by *Oenococcus oeni*. *International Journal of Food Microbiology*, 140(2), 136-145.
- Foligné, B., George, F., Standaert, A., Garat, A., Poiret, S., Peucelle, V., Ferreira, S., Sobry, H., Muharram, G., Lucau-Danila, A., & Daniel, C. (2020). High-dose dietary supplementation with zinc prevents gut inflammation: Investigation of the role of metallothioneins and beyond by transcriptomic and metagenomic studies. *The FASEB Journal*, 34(9), 12615-12633.
- Forbes, J. D., Van Domselaar, G., & Bernstein, C. N. (2016). The gut microbiota in immune-mediated inflammatory diseases. *Frontiers in Microbiology*, 7.

- Fowler, B. A., Kimmel, A., Woods, S., McConnell, E., & Grant', D. (1980). Chronic low-level lead toxicity in the rat. 19.
- Fresquez, M. R., Pappas, R. S., & Watson, C. H. (2013). Establishment of toxic metal reference range in tobacco from U.S. cigarettes. *Journal of analytical toxicology*, 37(5), 298-304.
- Freter, R. (1974). Interactions between mechanisms controlling the intestinal microflora. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 27(12), 1409-1416.
- Fuchs, S., Sontag, G., Stidl, R., Ehrlich, V., Kundi, M., & Knasmüller, S. (2008). Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 46(4), 1398-1407.

G

- Gandhi, S., Santelli, J., Mitchell, D. H., Wesley Stiles, J., & Rao Sanadi, D. (1980). A simple method for maintaining large, aging populations of *Caenorhabditis elegans*. *Mechanisms of Ageing and Development*, 12(2), 137-150.
- Gänzle, M. G. (2015). Lactic metabolism revisited: Metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*, 2, 106-117.
- Geng, H.-X., & Wang, L. (2019). Cadmium: Toxic effects on placental and embryonic development. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 67, 102-107.
- George, F., Daniel, C., Thomas, M., Singer, E., Guilbaud, A., Tessier, F. J., Revol-Junelles, A.-M., Borges, F., & Foligné, B. (2018). Occurrence and dynamism of Lactic Acid Bacteria in distinct ecological niches: A multifaceted functional health perspective. *Frontiers in Microbiology*, 9.
- George, F., Mahieux, S., Beauval, N., Houcke, I., Neut, C., Allorge, D., Foligné, B., & Garat, A. (2019). Les bactéries alimentaires et intestinales au service de la bioremédiation des métaux lourds : Détermination de leur capacité de capture par ICP-MS. *Toxicologie Analytique et Clinique*, 31(2, Supplement), S45-S46.
- George, F., Mahieux, S., Daniel, C., Titécat, M., Beauval, N., Houcke, I., Neut, C., Allorge, D., Borges, F., Jan, G., Foligné, B., & Garat, A. (2021). Assessment of Pb(II), Cd(II), and Al(III) removal capacity of bacteria from food and gut ecological niches : Insights into biodiversity to limit intestinal bioavailability of toxic metals. *Microorganisms*, 9(2), 456.
- Gerbino, E., Mobili, P., Tymczynsyn, E., Fausto, R., & Gómez-Zavaglia, A. (2011). FTIR spectroscopy structural analysis of the interaction between *Lactobacillus kefir* S-layers and metal ions. *Journal of Molecular Structure*, 987(1), 186-192.
- Goff, H. D. (1997). Colloidal aspects of ice cream—A review. *International Dairy Journal*, 7(6), 363-373.
- Goldstein, E., Tyrrell, K., & Citron, D. (2015). *Lactobacillus* Species: Taxonomic complexity and controversial susceptibilities. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 60 Suppl 2, S98-S107.

- Górska, S., Schwarzer, M., Jachymek, W., Srutkova, D., Brzozowska, E., Kozakova, H., & Gamian, A. (2014). Distinct immunomodulation of bone marrow-derived dendritic cell responses to *Lactobacillus plantarum* WCFS1 by two different polysaccharides isolated from *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0900. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 6506-6516.
- Gosmann, C., Anahtar, M. N., Handley, S. A., Farcasanu, M., Abu-Ali, G., Bowman, B. A., Padavattan, N., Desai, C., Droit, L., Moodley, A., Dong, M., Chen, Y., Ismail, N., Ndung'u, T., Ghebremichael, M. S., Wesemann, D. R., Mitchell, C., Dong, K. L., Huttenhower, C., ... Kwon, D. S. (2017). *Lactobacillus*-deficient cervicovaginal bacterial communities are associated with increased HIV acquisition in young South African Women. *Immunity*, 46(1), 29-37.
- Graziano, J. H., & Blum, C. (1991). Lead exposure from lead crystal. *The Lancet*, 337(8734), 141-142.
- Gulson, B. L., Jameson, C. W., Mahaffey, K. R., Mizon, K. J., Korsch, M. J., & Vimpani, G. (1997). Pregnancy increases mobilization of lead from maternal skeleton. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 130(1), 51-62.
- Gupta, A., & Joia, J. (2016). Microbes as potential tool for remediation of heavy metals: A Review. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 8.

H

- Haemers, J., Simonnot, M.-O. (2018). Traitement des sols par désorption thermique conventionnelle. *Techniques de l'Ingenieur*, J3984.
- Halttunen, T., Collado, M. C., El-Nezami, H., Meriluoto, J., & Salminen, S. (2008a). Combining strains of lactic acid bacteria may reduce their toxin and heavy metal removal efficiency from aqueous solution. *Letters in Applied Microbiology*, 46(2), 160-165
- Halttunen, T., Salminen, S., Meriluoto, J., Tahvonen, R., & Lertola, K. (2008b). Reversible surface binding of cadmium and lead by lactic acid and bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 125(2), 170-175.
- Halttunen, T., Salminen, S., & Tahvonen, R. (2007). Rapid removal of lead and cadmium from water by specific lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 114(1), 30-35.
- Harada, H., Kurauchi, M., Hayashi, R., & Eki, T. (2007). Shortened lifespan of nematode *Caenorhabditis elegans* after prolonged exposure to heavy metals and detergents. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66(3), 378-383.
- Harata, G., He, F., Hiruta, N., Kawase, M., Kubota, A., Hiramatsu, M., & Yausi, H. (2010). Intranasal administration of *Lactobacillus rhamnosus* GG protects mice from H1N1 influenza virus infection by regulating respiratory immune responses. *Letters in Applied Microbiology*, 50(6), 597-602.
- Harrington, C. R., Wischik, C. M., McArthur, F. K., Taylor, G. A., Edwardson, J. A., & Candy, J. M. (1994). Alzheimer's-disease-like changes in tau protein processing: Association with aluminum accumulation in brains of renal dialysis patients. *The Lancet*, 343(8904), 993-997.

- Hartemink, R., Rombouts, F. M. (1999). Comparison of media for the detection of bifidobacteria, lactobacilli and total anaerobes from faecal samples. *J Microbiol Methods*, 36, 181–192
- Heeney, D. D., Gareau, M. G., & Marco, M. L. (2018). Intestinal *Lactobacillus* in health and disease, a driver or just along for the ride? *Current opinion in biotechnology*, 49, 140-147.
- Hérias, M. V., Midtvedt, T., Hanson, L. A., & Wold, A. E. (1997). *Escherichia coli* K5 capsule expression enhances colonization of the large intestine in the gnotobiotic rat. *Infection and Immunity*, 65(2), 531-536.
- Hernandez-Mendoza, A., González-Córdova, A. F., Vallejo-Cordoba, B., & Garcia, H. S. (2011). Effect of oral supplementation of *Lactobacillus reuteri* in reduction of intestinal absorption of aflatoxin B1 in rats. *Journal of Basic Microbiology*, 51(3), 263-268.
- Hevia, A., Delgado, S., Sánchez, B., & Margolles, A. (2015). Molecular players involved in the interaction between beneficial bacteria and the immune system. *Frontiers in Microbiology*, 6.
- Holo, H., Faye, T., Brede, D. A., Nilsen, T., Ødegård, I., Langsrud, T., Brendehaug, J., & Nes, I. F. (2002). Bacteriocins of propionic acid bacteria. *Le Lait*, 82(1), 59-68.
- Hsieh, F.-C., Lee, C., Chai, C.-Y., Chen, W.-T., Lu, Y.-C., & Wu, C.-S. (2013). Oral administration of *Lactobacillus reuteri* GMNL-263 improves insulin resistance and ameliorates hepatic steatosis in high fructose-fed rats. *Nutrition & metabolism*, 10, 35.
- Huang, F., Wang, Z.-H., Cai, Y.-X., Chen, S.-H., Tian, J.-H., & Cai, K.-Z. (2018). Heavy metal bioaccumulation and cation release by growing *Bacillus cereus* RC-1 under culture conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 157, 216-226.
- Hudson, K. M., Belcher, S. M., & Cowley, M. (2019). Maternal cadmium exposure in the mouse leads to increased heart weight at birth and programs susceptibility to hypertension in adulthood. *Scientific Reports*, 9(1), 13553.
- Hungate, R. E. (1969). Chapter IV A Roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In J. R. Norris & D. W. Ribbons (Éds.), *Methods in Microbiology* (Vol. 3, p. 117-132). Academic Press.
- Hunt, P. R., Olejnik, N., & Sprando, R. (2012). Toxicity ranking of heavy metals with screening method using adult *C. elegans* and propidium iodide replicates toxicity ranking in rat. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 50(9), 3280-3290.
- Huycke, M., Abrams, V., & Moore, D. (2002). *Enterococcus faecalis* produces extracellular superoxide and hydrogen peroxide that damages colonic epithelial cell DNA. *Carcinogenesis*, 23, 529-536.

1

- Igbokwe, I. O., Igwenagu, E., & Igbokwe, N. A. (2019). Aluminium toxicosis: A review of toxic actions and effects. *Interdisciplinary Toxicology*, 12(2), 45-70.

- INERIS. (2011). Cadmium et ses dérivés. *Fiches de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques*.
- INRS (Institut National de la Recherche et de la Sécurité). (2014). Aluminium et ses composés minéraux. *Base de données Fiches Toxicologiques, Fiche Toxicologique n°306*.
- INRS (Institut National de la Recherche et de la Sécurité). (2019). Cadmium et composés minéraux. *Base de données Fiches Toxicologiques, Fiche toxicologique n°60*.
- INRS (Institut National de la Recherche et de la Sécurité). (2020). Plomb et composés minéraux. *Base de données Fiches Toxicologiques, Fiche toxicologique n°59*.
- Institut de Veille Sanitaire. (2003). Aluminium, Quels risques pour la santé ? Synthèse des études épidémiologiques. *Volet épidémiologique de l'expertise collective InVS-Afssa-Afssaps*, 184 p.
- Isawa K, Hojo K, Yoda N, Kamiyama T, Makino S, Saito M, Sugano H, Mizoguchi C, Kurama S, Shibasaki M, Endo N, Sato Y (2002) Isolation and identification of a new bifidogenic growth stimulator produced by *Propionibacterium freudenreichii* ET-3. *Biosci Biotechnol Biochem*, 66, 679–681
- Islam, S. M., Math, R., Cho, K., Lim, W., Hong, S., Kim, J., Yun, M., Cho, J., & Yun, H. (2010). Organophosphorus hydrolase (OpdB) of *Lactobacillus brevis* WCP902 from Kimchi is able to degrade organophosphorus pesticides. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58, 5380-5386.

J

- Jan, G., Belzacq, A.-S., Haouzi, D., Rouault, A., Métivier, D., Kroemer, G., Brenner, C. (2002). Propionibacteria induce apoptosis of colorectal carcinoma cells via short-chain fatty acids acting on mitochondria. *Cell Death & Differentiation*, 9(2), 179-188.
- Jebali, R., Abbès, S., Salah-Abbès, J. B., Younes, R. B., Haous, Z., Oueslati, R. (2015). Ability of *Lactobacillus plantarum* MON03 to mitigate aflatoxins (B1 and M1) immunotoxicities in mice. *Journal of Immunotoxicology*, 12(3), 290-299.
- Ji, Y., Park, S., Park, H., Hwang, E., Shin, H., Pot, B., Holzapfel, W. H. (2018). Modulation of Active Gut Microbiota by *Lactobacillus rhamnosus* GG in a diet induced obesity murine model. *Frontiers in Microbiology*, 9.
- Jia, X., Li, Y., Xu, T., & Wu, K. (2020). Display of lead-binding proteins on *Escherichia coli* surface for lead bioremediation. *Biotechnology and Bioengineering*, 117(12), 3820-3834.
- Jin, H., Jeong, Y., Yoo, S.-H., Johnston, T. V., Ku, S., Ji, G. E. (2019). Isolation and characterization of high exopolysaccharide-producing *Weissella confusa* VP30 from young children's feces. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 110.

K

- Kaneko T (1999) A novel bifidogenic growth stimulator produced by *Propionibacterium freudenreichii*. *Biosci Microflora*, 18, 73–80.
- Kaneko T, Mori H, Iwata M, Meguro S (1994) Growth stimulator for bifidobacteria produced by *Propionibacterium freudenreichii* and several intestinal bacteria. *J Dairy Sci*, 77, 393–404
- Kamboj, K., Vasquez, A., & Balada-Llasat, J.-M. (2015). Identification and significance of *Weissella* species infections. *Frontiers in Microbiology*, 6.
- Karlsson, F. H., Tremaroli, V., Nookaew, I., Bergström, G., Behre, C. J., Fagerberg, B., Nielsen, J., & Bäckhed, F. (2013). Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature*, 498(7452), 99-103.
- Kasimatis, K. R., Moerdyk-Schauwecker, M. J., & Phillips, P. C. (2018). Auxin-mediated sterility induction system for longevity and mating studies in *Caenorhabditis elegans*. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 8(8), 2655-2662.
- Kawahara, M., & Kato-Negishi, M. (2011). Link between aluminum and the pathogenesis of Alzheimer's disease: The integration of the aluminum and amyloid cascade hypotheses. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2011.
- Kawano, A., Ishikawa, H., Mutoh, M., Kubota, H., Matsuda, K., Tsuji, H., Matsumoto, K., Nomoto, K., Tanaka, R., Nakamura, T., Wakabayashi, K., & Sakai, T. (2018). Higher *enterococcus* counts indicate a lower risk of colorectal adenomas: A prospective cohort study. *Oncotarget*, 9(30), 21459-21467.
- Kekkonen, R. A., Kajasto, E., Miettinen, M., Veckman, V., Korpela, R., & Julkunen, I. (2008). Probiotic *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *Cremoris* and *Streptococcus thermophilus* induce IL-12 and IFN- γ production. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 14(8), 1192-1203.
- Kim, Y., Patel, D., Lee, D., Song, Y., & Bae, H. (2011). High cadmium-binding ability of a novel *Colocasia esculenta* metallothionein increases cadmium tolerance in *Escherichia coli* and Tobacco: Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry: Vol 75, No 10. *Biosci Biotechnol Biochem*, 75(10), 1912-1920.
- King, L. D., & Hajjar, L. M. (1990). The residual effect of sewage sludge on heavy metal content of Tobacco and Peanut. *Journal of Environmental Quality*, 19(4), 738-748.
- Kinoshita, H., Sohma, Y., Ohtake, F., Ishida, M., Kawai, Y., Kitazawa, H., Saito, T., & Kimura, K. (2013). Biosorption of heavy metals by lactic acid bacteria and identification of mercury binding protein. *Research in Microbiology*, 164(7), 701-709.
- Kippler Maria, Tofail Fahmida, Gardner Renee, Rahman Anisur, Hamadani Jena D., Bottai Matteo, & Vahter Marie. (2012). Maternal cadmium exposure during pregnancy and size at birth: A prospective cohort study. *Environmental Health Perspectives*, 120(2), 284-289.
- Kirillova, A. V., Danilushkina, A. A., Irisov, D. S., Bruslik, N. L., Fakhrullin, R. F., Zakharov, Y. A., Bukhmin, V. S., & Yarullina, D. R. (2017). Assessment of resistance and bioremediation ability of *Lactobacillus* strains to lead and cadmium. *International Journal of Microbiology*, 2017, 9869145.

- Konkel, L. (2013). The environment within: Exploring the role of the gut microbiome in health and disease. *Environmental Health Perspectives*, 121(9), A276-A281.
- Konstantinov, S. R., Smidt, H., de Vos, W. M., Bruijns, S. C. M., Singh, S. K., Valence, F., Molle, D., Lortal, S., Altermann, E., Klaenhammer, T. R., & van Kooyk, Y. (2008). S layer protein A of *Lactobacillus acidophilus* NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(49), 19474-19479.
- Kulecka, M., Paziewska, A., Zeber-Lubecka, N., Ambrozkiwicz, F., Kopczynski, M., Kuklinska, U., Pysniak, K., Gajewska, M., Mikula, M., & Ostrowski, J. (2016). Prolonged transfer of feces from the lean mice modulates gut microbiota in obese mice. *Nutrition & Metabolism*, 13(1).
- Kumar, N., Kumar, V., Panwar, R., & Ram, C. (2017). Efficacy of indigenous probiotic *Lactobacillus* strains to reduce cadmium bioaccessibility—An *in vitro* digestion model. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(2), 1241-1250.
- Kumar, N., Kumari, V., Ram, C., Thakur, K., & Tomar, S. K. (2018). Bio-prospectus of cadmium bioadsorption by lactic acid bacteria to mitigate health and environmental impacts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(4), 1599-1615.

L

- Lallemand-Barres, A., Ministère de l'Écologie et du Développement durable : Direction de l'Eau, et Bureau de Recherches Géologiques et Minières (BRGM). (1993). *Méthodes de dépollution des sols et des eaux pollués par les métaux* (R 36682 ENV-4S-93). BRGM.
- Lan, A., Bruneau, A., Bensaada, M., Catherine, P., Pascale, B., Rabot, S., & Jan, G. (2008). Increased induction of apoptosis by *Propionibacterium freudenreichii* TL133 in colonic mucosal crypts of human microbiota-associated rats treated with 1,2-dimethylhydrazine. *The British journal of nutrition*, 100, 1251-1259.
- Langsrud, T., & Reinbold, G. W. (1973). Flavor development and microbiology of swiss cheese-a review. *Journal of Milk and Food Technology*, 36(12), 593-609.
- Lanphear, B. P., Hornung, R., Khourey, J., Yolton, K., Baghurst, P., Bellinger, D. C., Canfield, R. L., Dietrich, K. N., Bornschein, R., Greene, T., Rothenberg, S. J., Needleman, H. L., Schnaas, L., Wasserman, G., Graziano, J., & Roberts, R. (2005). Low-level environmental lead exposure and children's intellectual function: An international pooled analysis. *Environmental Health Perspectives*, 113(7), 894-899.
- Larsen, N., Vogensen, F. K., van den Berg, F. W. J., Nielsen, D. S., Andreasen, A. S., Pedersen, B. K., Al-Soud, W. A., Sørensen, S. J., Hansen, L. H., & Jakobsen, M. (2010). Gut microbiota in Human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS ONE*, 5(2).
- Le Journal de l'Environnement. (2007, novembre). Plomb dans les jouets : Etats-Unis et Europe réagissent—Journal de l'environnement.
- Le Maréchal, C., Peton, V., Plé, C., Vroland, C., Jardin, J., Briard-Bion, V., Durant, G., Chuat, V., Loux, V., Foligné, B., Deutsch, S.-M., Falentin, H., & Jan, G. (2015). Surface proteins of *Propionibacterium freudenreichii* are involved in its anti-inflammatory properties. *Journal of Proteomics*, 113, 447-461.

- Le Monde. (2007, août). Mattel rappelle plus de 18 millions de jouets fabriqués en Chine. *Le Monde.fr*.
- Lebeer, S., Claes, I., Tytgat, H. L. P., Verhoeven, T. L. A., Marien, E., Ossowski, I. von, Reunanen, J., Palva, A., Vos, W. M. de, Keersmaecker, S. C. J. D., & Vanderleyden, J. (2012). Functional Analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG Pili in Relation to Adhesion and Immunomodulatory Interactions with Intestinal Epithelial Cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(1), 185-193.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. C. J. (2010). Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: Comparison with commensals and pathogens. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(3), 171-184.
- Leblanc, J.-C., Guérin, T., Noël, L., Calamassi-Tran, G., Volatier, J.-L., & Verger, P. (2005). Dietary exposure estimates of 18 elements from the 1st French Total Diet Study. *Food additives and contaminants*, 22, 624-641.
- Lebreton, F., Schaik, W. van, McGuire, A. M., Godfrey, P., Griggs, A., Mazumdar, V., Corander, J., Cheng, L., Saif, S., Young, S., Zeng, Q., Wortman, J., Birren, B., Willems, R. J. L., Earl, A. M., & Gilmore, M. S. (2013). Emergence of epidemic multidrug-resistant *Enterococcus faecium* from animal and commensal strains. *MBio*, 4(4).
- Leroy, F., & De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 67-78.
- Leulier, F., & Royet, J. (2009). Maintaining immune homeostasis in fly gut. *Nature Immunology*, 10(9), 936-938.
- Leung, M. C. K., Williams, P. L., Benedetto, A., Au, C., Helmcke, K. J., Aschner, M., & Meyer, J. N. (2008). *Caenorhabditis elegans*: An emerging model in biomedical and environmental toxicology. *Toxicological Sciences*, 106(1), 5-28.
- Ley, R., Turnbaugh, P., Klein, S., & Gordon, J. (2007). Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444, 1022-1023.
- Li, B., Jin, D., Yu, S., Etereri Evvie, S., Muhammad, Z., Huo, G., & Liu, F. (2017). *In vitro* and *In vivo* evaluation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* KLDS1.0207 for the alleviative effect on lead toxicity. *Nutrients*, 9(8).
- Liddicoat, P. V., Liao, X.-Z., Zhao, Y., Zhu, Y., Murashkin, M. Y., Lavernia, E. J., Valiev, R. Z., & Ringer, S. P. (2010). Nanostructural hierarchy increases the strength of aluminium alloys. *Nature Communications*, 1(1), 63.
- Lin, D., Cao, H., Zhong, Y., Huang, Y., Zou, J., He, Q., Ji, R., Qin, T., Chen, Y., Wang, D., Wu, Z., Qin, W., Wu, D., Chen, H., & Zhang, Q. (2019a). Screening and identification of Lactic acid bacteria from Ya'an pickle water to effectively remove Pb²⁺. *AMB Express*, 9.
- Lin, D., Ji, R., Wang, D., Xiao, M., Zhao, J., Zou, J., Li, Y., Qin, T., Xing, B., Chen, Y., Liu, P., Wu, Z., Wang, L., Zhang, Q., Chen, H., Qin, W., Wu, D., Liu, Y., Liu, Y., & Li, S. (2019b). The research progress in mechanism and influence of biosorption between lactic acid bacteria and Pb(II) : A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(3), 395-410.

- Lin, P. W., Myers, L. E. S., Ray, L., Song, S.-C., Nasr, T. R., Berardinelli, A. J., Kundu, K., Murthy, N., Hansen, J. M., & Neish, A. S. (2009). *Lactobacillus rhamnosus* blocks inflammatory signaling *in vivo* via reactive oxygen species generation. *Free radical biology & medicine*, 47(8), 1205-1211.
- Linke, D. (2009). Chapter 34 Detergents: An Overview. In R. R. Burgess & M. P. Deutscher (Éds.), *Methods in Enzymology* (Vol. 463, p. 603-617). Academic Press.
- Liu, J., Li, L., Wang, Y., Yan, C., & Liu, X. (2013). Impact of low blood lead concentrations on IQ and school performance in Chinese children. *PLOS ONE*, 8(5), e65230.
- Lortal, S., Licitra, G., & Valence, F. (2014). Wooden Tools: Reservoirs of microbial biodiversity in traditional cheesemaking. *Microbiology Spectrum*, 2(1).

M

- Macpherson, A. J., Harris, N. L. (2004). Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 4(6), 478-485.
- Malik, A. C., Reinbold, G. W., Vedamuthu, E. R. (2011). An evaluation of the taxonomy of *Propionibacterium*. *Canadian Journal of Microbiology*.
- Mandriota, S. J., Tenan, M., Ferrari, P., & Sappino, A. (2016). Aluminium chloride promotes tumorigenesis and metastasis in normal murine mammary gland epithelial cells. *International Journal of Cancer*, 139(12), 2781-2790.
- Marteau, P. (2011). Evidence of probiotic strain specificity makes extrapolation of results impossible from a strain to another, even from the same species. *Annals of Gastroenterology & Hepatology*.
- Mathur, H., Field, D., Rea, M. C., Cotter, P. D., Hill, C., Ross, R. P. (2017). Bacteriocin-antimicrobial synergy: a medical and food perspective. *Frontiers in Microbiology*, 8.
- Martinez, M. P., Pereyra, M. L. G., Pena, G. A., Poloni, V., Juri, G. F., Cavaglieri, L. R. (2017). *Pediococcus acidolactici* and *Pediococcus pentosaceus* isolated from a rainbow trout ecosystem have probiotic and ABF1 adsorbing/degrading abilities *in vitro*. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 34(12), 2118-2130.
- Maurice, C. F., CL Knowles, S., Ladau, J., Pollard, K. S., Fenton, A., Pedersen, A. B., Turnbaugh, P. J. (2015). Marked seasonal variation in the wild mouse gut microbiota. *The ISME Journal*, 9(11), 2423-2434.
- McAuliffe, O. (2018). Symposium review: *Lactococcus lactis* from nondairy sources: Their genetic and metabolic diversity and potential applications in cheese¹. *Journal of Dairy Science*, 101(4), 3597-3610.
- McGrath, K. G. (2003). An earlier age of breast cancer diagnosis related to more frequent use of antiperspirants/deodorants and underarm shaving. *European Journal of Cancer Prevention*, 12(6), 479-485.
- Meile, L., Le Blay, G., Thierry, A. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: *Propionibacterium* and *Bifidobacterium*. *International Journal of Food Microbiology*, 126(3), 316-320.

- Miller, E. A., Beasley, D. E., Dunn, R. R., & Archie, E. A. (2016). Lactobacilli dominance and vaginal pH: why is the human vaginal microbiome unique? *Frontiers in Microbiology*, 7.
- Min, M. O., Singer, L. T., Kirchner, H. L., Minnes, S., Short, E., Hussain, Z., Nelson, S. (2009). Cognitive development and low-level lead exposure in poly-drug exposed children. *Neurotoxicology and Teratology*, 31(4), 225-231.
- Minervini, F., Celano, G., Lattanzi, A., Tedone, L., De Mastro, G., Gobbetti, M., De Angelis, M. (2015). Lactic Acid Bacteria in durum wheat flour are endophytic components of the plant during its entire life cycle. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(19), 6736-6748.
- Ministère des Solidarités et de la Santé. (2002). Les effets du plomb sur la santé.
- Ministère des Solidarités et de la Santé. (2019, mars). Eau et plomb. *Ministère des Solidarités et de la Santé*.
- Ministère de l'Écologie et du Développement Durable Français. (2006). Circulaire DNP/CFF N° 2006-11 du 04/06/06 relative à la définition des zones sur lesquelles a été instaurée une interdiction de l'usage du plomb de chasse.
- Mogensen, G., Salminen, S., O'Brien, J., Ouwehand, A., Holzapfel, W., Shortt, C., Fondén, R., Miller, G. D., Donohue, D., Playne, M., Crittenden, R., Salvadori, B. B., Zink, R. (2002). Inventory of Microorganisms with a documented history of use in food. *International Dairy Federation*.
- Mohapatra, R. K., Parhi, P. K., Pandey, S., Bindhani, B. K., Thatoi, H., Panda, C. R. (2019). Active and passive biosorption of Pb(II) using live and dead biomass of marine bacterium *Bacillus xiamenensis* PbRPSD202 : Kinetics and isotherm studies. *Journal of Environmental Management*, 247, 121-134.
- Monachese, M., Burton, J. P., Reid, G. (2012). Bioremediation and tolerance of humans to heavy metals through microbial processes: a potential role for probiotics? *Applied and Environmental Microbiology*, 78(18), 6397-6404.
- Moroti, C., Souza Magri, L. F., de Rezende Costa, M., Cavallini, D. C., Sivieri, K. (2012). Effect of the consumption of a new symbiotic shake on glycemia and cholesterol levels in elderly people with type 2 diabetes mellitus. *Lipids in Health and Disease*, 11, 29.
- Moyson, S., Vissenberg, K., Fransen, E., Blust, R., Husson, S. J. (2018). Mixture effects of copper, cadmium, and zinc on mortality and behavior of *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 37(1), 145-159.
- Muhammad, Z., Ramzan, R., Zhang, S., Hu, H., Hameed, A., Bakry, A. M., Dong, Y., Wang, L., Pan, S. (2018). Comparative assessment of the bioremedial potentials of potato resistant starch-based microencapsulated and non-encapsulated *Lactobacillus plantarum* to alleviate the effects of chronic lead toxicity. *Frontiers in Microbiology*, 9.
- Mushak, P. (1991). Gastro-intestinal absorption of lead in children and adults: overview of biological and biophysico-chemical aspects. *Chemical Speciation & Bioavailability*, 3(3-4), 87-104.

N

- Nair, D., Kollanoor-Johny, A. (2017). Effect of *Propionibacterium freudenreichii* on *Salmonella* multiplication, motility, and association with avian epithelial cells¹. *Poultry Science*, 96(5), 1376-1386.
- Nguyen, T. L. A., Vieira-Silva, S., Liston, A., Raes, J. (2015). How informative is the mouse for human gut microbiota research? *Disease Models & Mechanisms*, 8(1), 1-16.
- Nicholson, W. L., Davis, C. L., Shapiro, N., Huntemann, M., Clum, A., Reddy, T. B. K., Pillay, M., Markowitz, V., Varghese, N., Pati, A., Ivanova, N., Kyrpides, N., Woyke, T. (2016). An improved high-quality draft genome sequence of *Carnobacterium inihbens* subsp. *Inihbens* strain K1T. *Standards in Genomic Sciences*, 11(1), 65.
- Nielsen, H. B., Almeida, M., Juncker, A. S., Rasmussen, S., Li, J., Sunagawa, S., Plichta, D. R., Gautier, L., Pedersen, A. G., Le Chatelier, E., Pelletier, E., Bonde, I., Nielsen, T., Manichanh, C., Arumugam, M., Batto, J.-M., Quintanilha dos Santos, M. B., Blom, N., Borruel, N., Ehrlich, S. D. (2014). Identification and assembly of genomes and genetic elements in complex metagenomic samples without using reference genomes. *Nature Biotechnology*, 32(8), 822-828.
- Nikbakht-Nasrabadi, E., Jamaluddin, R., Mutalib, M. S. A., Khaza'ai, H., Khalesi, S., Redzwan, S. M. (2013). Reduction of aflatoxin level in aflatoxin-induced rats by the activity of probiotic *Lactobacillus casei* strain Shirota. *Journal of Applied Microbiology*, 114(5), 1507-1515.
- Nordic Council of Minister. (2003). Cadmium Review.
- NTP. (2012). NTP monograph on health effects of low-level lead. *NTP Monograph*, 1, xiii, xv-148.

O

- Ochman, H., Selander, R. K. (1984). Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *Journal of Bacteriology*, 157(2), 690-693.
- Ojekunle, O., Banwo, K., Sanni, A. I. (2017). *In vitro* and *in vivo* evaluation of *Weissella cibaria* and *Lactobacillus plantarum* for their protective effect against cadmium and lead toxicities. *Letters in Applied Microbiology*, 64(5), 379-385.
- Okada, Y., Tsuzuki, Y., Miyazaki, J., Matsuzaki, K., Hokari, R., Komoto, S., Kato, S., Kawaguchi, A., Nagao, S., Itoh, K., Watanabe, T., Miura, S. (2006). *Propionibacterium freudenreichii* component 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid (DHNA) attenuates dextran sodium sulphate induced colitis by modulation of bacterial flora and lymphocyte homing. *Gut*, 55(5), 681-688.
- Olaya-Abril, A., Jiménez-Munguía, I., Gómez-Gascón, L., Rodríguez-Ortega, M. J. (2014). Surfomics : Shaving live organisms for a fast proteomic identification of surface proteins. *Journal of Proteomics*, 97, 164-176.
- Olson, H., Betton, G., Robinson, D., Thomas, K., Monro, A., Kolaja, G., Lilly, P., Sanders, J., Sipes, G., Bracken, W., Dorato, M., Van Deun, K., Smith, P., Berger, B., Heller, A. (2000). Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 32(1), 56-67.

Olsson, I.-M., Bensryd, I., Lundh, T., Ottosson, H., Skerfving, S., Oskarsson, A. (2002). Cadmium in blood and urine—Impact of sex, age, dietary intake, iron status, and former smoking—Association of renal effects. *Environmental Health Perspectives*, 110(12), 1185-1190.

Organisation Mondiale de la Santé (OMS), Programme des Nations Unies pour l'Environnement (UNEP). (2012). Plan d'activités de l'Alliance mondiale pour l'élimination des peintures au plomb.

P

Papadimitriou, K., Zoumpopoulou, G., Foligné, B., Alexandraki, V., Kazou, M., Pot, B., Tsakalidou, E. (2015). Discovering probiotic microorganisms: *In vitro*, *in vivo*, genetic and omics approaches. *Frontiers in Microbiology*, 6.

Paul, M. L., Samuel, J., Chandrasekaran, N., Mukherjee, A. (2012). Comparative kinetics, equilibrium, thermodynamic and mechanistic studies on biosorption of hexavalent chromium by live and heat killed biomass of *Acinetobacter junii* VITSUKMW2, an indigenous chromite mine isolate. *Chemical Engineering Journal*, 187, 104-113.

Park, S., Ji, Y., Jung, H.-Y., Park, H., Kang, J., Choi, S.-H., Shin, H., Hyun, C.-K., Kim, K.-T., Holzapfel, W. H. (2017). *Lactobacillus plantarum* HAC01 regulates gut microbiota and adipose tissue accumulation in a diet-induced obesity murine model. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(4), 1605-1614.

Pazos, M., Rosales, E., Alcántara, T., Gómez, J., Sanromán, M. A. (2010). Decontamination of soils containing PAHs by electroremediation: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 177(1), 1-11.

Pei, F., Li, B., Zhang, Z., Yu, F., Li, X., Lu, W., Cai, Q., Gao, H., Shen, L. (2014). Beneficial effects of phlorizin on diabetic nephropathy in diabetic db/db mice. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 28(5), 596-603.

Perez-Burgos, A., Wang, L., McVey Neufeld, K.-A., Mao, Y.-K., Ahmadzai, M., Janssen, L. J., Stanis, A. M., Bienenstock, J., Kunze, W. A. (2015). The TRPV1 channel in rodents is a major target for antinociceptive effect of the probiotic *Lactobacillus reuteri* DSM 17938. *The Journal of Physiology*, 593(Pt 17), 3943-3957.

Pessione, E. (2012). Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: Lights and shadows. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2.

Pineton de Chambrun, G., Body-Malapel, M., Frey-Wagner, I., Djouina, M., Deknuydt, F., Atrott, K., Esquerre, N., Altare, F., Neut, C., Arrieta, M. C., Kanneganti, T.-D., Rogler, G., Colombel, J.-F., Cortot, A., Desreumaux, P., Vignal, C. (2014). Aluminum enhances inflammation and decreases mucosal healing in experimental colitis in mice. *Mucosal Immunology*, 7(3), 589-601.

Plé, C., Breton, J., Daniel, C., Foligné, B. (2015). Maintaining gut ecosystems for health: Are transitory food bugs stowaways or part of the crew? *International Journal of Food Microbiology*, 213, 139-143.

Poupet, C., Saraoui, T., Veisseire, P., Bonnet, M., Dausset, C., Gachinat, M., Camarès, O., Chassard, C., Nivoliez, A., & Bornes, S. (2019). *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35 as an effective treatment for preventing *Candida albicans* infection in the invertebrate model *Caenorhabditis elegans*: First mechanistic insights. *PLoS ONE*, 14(11).

Pourret, O. (2018). On the necessity of banning the term “Heavy Metal” from the scientific literature. *Sustainability*, 10(8), 2879.

Pradel, E., Zhang, Y., Pujol, N., Matsuyama, T., Bargmann, C. I., & Ewbank, J. J. (2007). Detection and avoidance of a natural product from the pathogenic bacterium *Serratia marcescens* by *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(7), 2295-2300.

Puranik, P. R., & Paknikar, K. M. (1997). Biosorption of lead and zinc from solutions using *Streptovercillium cinnamoneum* waste biomass. *Journal of Biotechnology*, 55(2), 113-124.

Puranik, P. R., & Paknikar, K. M. (1999). Biosorption of lead, cadmium, and zinc by *Citrobacter* Strain MCM B-181: characterization studies. *Biotechnology Progress*, 15(2), 228-237.

R

Rabah, H., do Carmo, F. L. R., & Jan, G. (2017). Dairy *Propionibacterium*: versatile probiotics. *Microorganisms*, 5(2).

Rahman, A., Gleinser, M., Lanhers, M.-C., Riedel, C. U., Foligné, B., Hanse, M., Yen, F. T., Klouj, A., Afzal, M. I., Back, A., Mangavel, C., Cailliez-Grimal, C., Revol-Junelles, A.-M., & Borges, F. (2014). Adaptation of the lactic acid bacterium *Carnobacterium maltaromaticum* LMA 28 to the mammalian gastrointestinal tract: From survival in mice to interaction with human cells. *International Dairy Journal*, 34(1), 93-99.

Rahmouni, O., Vignal, C., Titécat, M., Foligné, B., Pariente, B., Dubuquoy, L., Desreumaux, P., & Neut, C. (2018). High carriage of adherent invasive *E. coli* in wildlife and healthy individuals. *Gut Pathogens*, 10.

Randhawa, P. K., Singh, K., Singh, N., & Jaggi, A. S. (2014). A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology: Official Journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*, 18(4), 279-288.

Remot, A., Descamps, D., Noordine, M.-L., Boukadiri, A., Mathieu, E., Robert, V., Riffault, S., Lambrecht, B., Langella, P., Hammad, H., & Thomas, M. (2017). Bacteria isolated from lung modulate asthma susceptibility in mice. *The ISME Journal*, 11(5), 1061-1074.

Riddle, D. L., Blumenthal, T., Meyer, B. J., & Priess, J. R. (Éds.). (1997). *C. elegans II* (2nd éd.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Riess, M. L., & Halm, J. K. (2007). Lead poisoning in an adult: lead mobilization by pregnancy? *Journal of General Internal Medicine*, 22(8), 1212-1215.

Ringel-Kulka, T., Goldsmith, J. R., Carroll, I. M., Barros, S. P., Palsson, O., Jobin, C., & Ringel, Y. (2014). Randomized clinical trial: *Lactobacillus Acidophilus* NCFM affects colonic mucosal opioid receptors expression in human patients with functional abdominal pain. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 40(2), 200-207.

Rivas-Jimenez, L., Ramírez-Ortiz, K., González-Córdova, A. F., Vallejo-Cordoba, B., Garcia, H. S., & Hernandez-Mendoza, A. (2016). Evaluation of acrylamide-removing properties of two *Lactobacillus* strains under simulated gastrointestinal conditions using a dynamic system. *Microbiological Research*, 190, 19-26.

- Rondeau, V., Commenges, D., Jacqmin-Gadda, H., & Dartigues, J.-F. (2000). Relation between aluminum concentrations in drinking water and Alzheimer's disease: An 8-year follow-up study. *American Journal of Epidemiology*, 152(1), 59-66.
- Rook, G. A. (2013). Regulation of the immune system by biodiversity from the natural environment: An ecosystem service essential to health. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(46), 18360-18367.
- Ros, C., & Mwanri, L. (2003). Lead exposure, interactions and toxicity: Food for thought. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 12(4), 388-395
- Rossi, M., Martínez-Martínez, D., Amaretti, A., Ulrici, A., Raimondi, S., & Moya, A. (2016). Mining metagenomic whole genome sequences revealed subdominant but constant *Lactobacillus* population in the human gut microbiota. *Environmental Microbiology Reports*, 8(3), 399-406.
- Rul, F., Ben-Yahia, L., Chegdani, F., Wrzosek, L., Thomas, S., Noordine, M.-L., Gitton, C., Cherbuy, C., Langella, P., & Thomas, M. (2011). Impact of the metabolic activity of *Streptococcus thermophilus* on the colon epithelium of gnotobiotic rats. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(12), 10288-10296.



- Santé Publique France. (2017). Imprégnation des femmes enceintes par les polluants de l'environnement en France en 2011 : Volet périnatal du programme national de biosurveillance mis en œuvre au sein de la cohorte Elfe - Tome 2 : métaux et métalloïdes.
- Satarug, S., Moore, M. R. (2004). Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke. *Environmental Health Perspectives*, 112(10), 1099-1103.
- Scholz, C. F. P., Kilian, M. (2016). The natural history of cutaneous propionibacteria, and reclassification of selected species within the genus *Propionibacterium* to the proposed novel genera *Acidipropionibacterium* gen. Nov., *Cutibacterium* gen. Nov. And *Pseudopropionibacterium* gen. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(11), 4422-4432.
- Schulenburg, H., Félix, M.-A. (2017). The natural biotic environment of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 206(1), 55-86.
- Serrano-Niño, J. C., Cavazos-Garduño, A., González-Córdova, A. F., Vallejo-Cordoba, B., Hernández-Mendoza, A., & García, H. S. (2014). In vitro Study of the Potential Protective Role of *Lactobacillus* Strains by Acrylamide Binding. *Journal of Food Safety*, 34(1), 62-68.
- Slykerman, R. F., Hood, F., Wickens, K., Thompson, J. M. D., Barthow, C., Murphy, R., Kang, J., Rowden, J., Stone, P., Crane, J., Stanley, T., Abels, P., Purdie, G., Maude, R., & Mitchell, E. A. (2017). Effect of *Lactobacillus rhamnosus* HN001 in pregnancy on postpartum symptoms of depression and anxiety: A randomised double-blind placebo-controlled trial. *EBioMedicine*, 24, 159-165.
- Sun, Z., Harris, H. M. B., McCann, A., Guo, C., Argimón, S., Zhang, W., Yang, X., Jeffery, I. B., Cooney, J. C., Kagawa, T. F., Liu, W., Song, Y., Salvetti, E., Wrobel, A., Rasinkangas, P., Parkhill, J., Rea, M. C.,

O'Sullivan, O., Ritari, J., ... O'Toole, P. W. (2015). Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera. *Nature Communications*, 6.

T

Tabuchi, M., Ozaki, M., Tamura, A., Yamada, N., Ishida, T., Hosoda, M., & Hosono, A. (2003). Antidiabetic effect of *Lactobacillus* GG in streptozotocin-induced diabetic rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67(6), 1421-1424.

Téllez-Rojo, M. M., Hernández-Avila, M., Lamadrid-Figueroa, H., Smith, D., Hernández-Cadena, L., Mercado, A., Aro, A., Schwartz, J., & Hu, H. (2004). Impact of bone lead and bone resorption on plasma and whole blood lead levels during pregnancy. *American Journal of Epidemiology*, 160(7), 668-678.

Tian, F., Zhai, Q., Zhao, J., Liu, X., Wang, G., Zhang, H., Zhang, H., & Chen, W. (2012). *Lactobacillus plantarum* CCFM8661 alleviates lead toxicity in mice. *Biological Trace Element Research*, 150(1), 264-271.

Topcu, A., & Bulat, T. (2010). Removal of cadmium and lead from aqueous solution by *Enterococcus faecium* strains. *Journal of Food Science*, 75(1), T13-T17.

Tremblay, Y. D. N., Hathroubi, S., & Jacques, M. (2014). Les biofilms bactériens : Leur importance en santé animale et en santé publique. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 78(2), 110-116.

Trinder, M., McDowell, T. W., Daisley, B. A., Ali, S. N., Leong, H. S., Sumarah, M. W., Reid, G. (2016). Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* reduces organophosphate pesticide absorption and toxicity to *Drosophila melanogaster*. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(20), 6204-6213.

Trompette, A., Gollwitzer, E. S., Yadava, K., Sichelstiel, A. K., Sprenger, N., Ngom-Bru, C., Blanchard, C., Junt, T., Nicod, L. P., Harris, N. L., & Marsland, B. J. (2014). Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nature Medicine*, 20(2), 159-166.

Truska, P., Rosival, L., Balázová, G., Hinst, J., Rippel, A., Palusová, O., & Grunt, J. (1989). Blood and placental concentrations of cadmium, lead, and mercury in mothers and their newborns. *Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology, and Immunology*, 33(2), 141-147.

Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., & Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444(7122), 1027-1031.

U

Ukena, S. N., Singh, A., Dringenberg, U., Engelhardt, R., Seidler, U., Hansen, W., Bleich, A., Bruder, D., Franzke, A., Rogler, G., Suerbaum, S., Buer, J., Gunzer, F., & Westendorf, A. M. (2007). Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity. *PLoS ONE*, 2(12).

Uraguchi, S., Watanabe, I., Yoshitomi, A., Kiyono, M., & Kuno, K. (2006). Characteristics of cadmium accumulation and tolerance in novel Cd-accumulating crops, *Avena strigosa* and *Crotalaria juncea*. *Journal of Experimental Botany*, 57(12), 2955-2965.

V

- Vahter, M. (2008). Health effects of early life exposure to arsenic. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 102(2), 204-211.
- Vahter, M., Berglund, M., Lind, B., Jorhem, L., Slorach, S., & Friberg, L. (1991). Personal monitoring of lead and cadmium exposure—A Swedish study with special reference to methodological aspects. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, 17(1), 65-74.
- Van Raamsdonk, J. M., & Hekimi, S. (2011). FUDR causes a twofold increase in the lifespan of the mitochondrial mutant *gas-1*. *Mechanisms of Ageing and Development*, 132(10), 519-521.
- Vesterlund, S., Karp, M., Salminen, S., & Ouwehand, A. C. (2006). *Staphylococcus aureus* adheres to human intestinal mucus but can be displaced by certain lactic acid bacteria. *Microbiology (Reading, England)*, 152(Pt 6), 1819-1826.
- Vignal, C., Desreumaux, P., & Body-Malapel, M. (2016). Gut: An underestimated target organ for aluminum. *Morphologie*, 100(329), 75-84.
- Voigt, R. M., Forsyth, C. B., Green, S. J., Mutlu, E., Engen, P., Vitaterna, M. H., Turek, F. W., & Keshavarzian, A. (2014). Circadian disorganization alters intestinal microbiota. *PLoS ONE*, 9(5).
- Voltan, S., Martinez, D., Elli, M., Brun, P., Longo, S., Porzionato, A., Macchi, V., D'Inca, R., Scarpa, M., Palù, G., Sturniolo, G. C., Morelli, L., & Castagliuolo, I. (2008). *Lactobacillus crispatus* M247-Derived H2O2 acts as a signal transducing molecule activating peroxisome proliferator activated receptor- γ in the intestinal mucosa. *Gastroenterology*, 135(4), 1216-1227.
- Vrieze, A., Van Nood, E., Holleman, F., Salojärvi, J., Kootte, R. S., Bartelsman, J. F. W. M., Dallinga-Thie, G. M., Ackermans, M. T., Serlie, M. J., Oozeer, R., Derrien, M., Druesne, A., Van Hylckama Vlieg, J. E. T., Bloks, V. W., Groen, A. K., Heilig, H. G. H. J., Zoetendal, E. G., Stroes, E. S., de Vos, W. M., Nieuwdorp, M. (2012). Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology*, 143(4), 913-916.e7.

W

- Wah Chu, K., & Chow, K. L. (2002). Synergistic toxicity of multiple heavy metals is revealed by a biological assay using a nematode and its transgenic derivative. *Aquatic Toxicology*, 61(1), 53-64.
- Walter, J., & Ley, R. (2011). The human gut microbiome: Ecology and recent evolutionary changes. *Annual Review of Microbiology*, 65(1), 411-429.
- Wang, S., Hibberd, M. L., Pettersson, S., & Lee, Y. K. (2014). *Enterococcus faecalis* from healthy infants modulates inflammation through MAPK signaling pathways. *PLoS ONE*, 9(5).
- Wang, Z., Wei, X., Yang, J., Suo, J., Chen, J., Liu, X., & Zhao, X. (2016). Chronic exposure to aluminum and risk of Alzheimer's disease: A meta-analysis. *Neuroscience Letters*, 610, 200-206.

- Williams, P. L., & Dusenbery, D. B. (1988). Using the nematode *Caenorhabditis elegans* to predict mammalian acute lethality to metallic salts. *Toxicology and Industrial Health*, 4(4), 469-478.
- Winter, S. A., Dölling, R., Knopf, B., Mendelski, M. N., Schäfers, C., & Paul, R. J. (2016). Detoxification and sensing mechanisms are of similar importance for Cd resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Heliyon*, 2(10), e00183.

X

- Xia, X., Zheng, D., Zhong, H., Qin, B., Gurr, G. M., Vasseur, L., Lin, H., Bai, J., He, W., & You, M. (2013). DNA sequencing reveals the midgut microbiota of diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) and a possible relationship with insecticide resistance. *PLOS ONE*, 8(7), e68852.

Y

- Yanagida, F., Chen, Y.-S., & Yasaki, M. (2007). Isolation and characterization of lactic acid bacteria from lakes. *Journal of Basic Microbiology*, 47(2), 184-190.
- Yildiz, H., Hantson, P., & Yombi, J.-C. (2018). Saturnisme après une réduction pondérale volontaire. *Toxicologie Analytique et Clinique*, 30(2, Supplement), S74.
- Young, J. L., & Cai, L. (2020). Implications for prenatal cadmium exposure and adverse health outcomes in adulthood. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 403, 115161.
- Yu, L., Zhai, Q., Liu, X., Wang, G., Zhang, Q., Zhao, J., Narbad, A., Zhang, H., Tian, F., & Chen, W. (2016). *Lactobacillus plantarum* CCFM639 alleviates aluminum toxicity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(4), 1891-1900.
- Yu, L., Zhai, Q., Yin, R., Li, P., Tian, F., Liu, X., Zhao, J., Gong, J., Zhang, H., & Chen, W. (2017a). *Lactobacillus plantarum* CCFM639 alleviate trace element imbalance-related oxidative stress in liver and kidney of chronic aluminum exposure mice. *Biological Trace Element Research*, 176(2), 342-349.
- Yu, L., Zhai, Q., Zhu, J., Zhang, C., Li, T., Liu, X., Zhao, J., Zhang, H., Tian, F., & Chen, W. (2017b). Dietary *Lactobacillus plantarum* supplementation enhances growth performance and alleviates aluminum toxicity in tilapia. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 143, 307-314.

Z

- Ziegler, E. E., Edwards, B. B., Jensen, R. L., Mahaffey, K. R., & Fomon, S. J. (1978). Absorption and retention of lead by infants. *Pediatric Research*, 12(1), 29-34.
- Zhai, Q., Qu, D., Feng, S., Yu, Y., Yu, L., Tian, F., Zhao, J., Zhang, H., & Chen, W. (2020). Oral supplementation of lead-intolerant intestinal microbes protects against lead (Pb) toxicity in mice. *Frontiers in Microbiology*, 10.
- Zhai, Q., Wang, J., Cen, S., Zhao, J., Zhang, H., Tian, F., & Chen, W. (2019). Modulation of the gut microbiota by a galactooligosaccharide protects against heavy metal lead accumulation in mice. *Food & Function*, 10(6), 3768-3781.
- Zhai, Q., Wang, G., Zhao, J., Liu, X., Narbad, A., Chen, Y. Q., Zhang, H., Tian, F., & Chen, W. (2014). Protective effects of *Lactobacillus plantarum* CCFM8610 against chronic cadmium toxicity in mice indicate routes of protection besides intestinal sequestration. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(13), 4063-4071.
- Zhai, Q., Wang, G., Zhao, J., Liu, X., Tian, F., Zhang, H., & Chen, W. (2013). Protective Effects of *Lactobacillus plantarum* CCFM8610 against acute cadmium toxicity in mice. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(5), 1508-1515.
- Zhang, L., Ward, J. D., Cheng, Z., & Dernburg, A. F. (2015). The auxin-inducible degradation (AID) system enables versatile conditional protein depletion in *C. elegans*. *Development (Cambridge, England)*, 142(24), 4374-4384.
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'Toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782-2858.
- Zoetendal, E. G., Akkermans, A. D. L., & De Vos, W. M. (1998). Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10), 3854-3859.

Annexes

Valorisation des Travaux de Thèses & autres contributions

Publications

George, F.; Daniel, C.; Thomas, M.; Singer, E.; Guilbaud, A.; Tessier, F. J.; Revol-Junelles, A.-M.; Borges, F.; Foligné, B. Occurrence and Dynamism of Lactic Acid Bacteria in Distinct Ecological Niches: A Multifaceted Functional Health Perspective. *Front Microbiol* **2018**, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02899>.

George, F.; Mahieux, S.; Daniel, C.; Titécat, M.; Beauval, N.; Houcke, I.; Neut, C.; Allorge, D.; Borges, F.; Jan, G.; Foligné, B.; Garat, A. Assessment of Pb(II), Cd(II), and Al(III) Removal Capacity of Bacteria from Food and Gut Ecological Niches: Insights into Biodiversity to Limit Intestinal Biodisponibility of Toxic Metals. *Microorganisms* **2021**, 9 (2), 456. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020456>.

Foligné, B.; **George, F.**; Standaert, A.; Garat, A.; Poirer, S.; Peucelle, V.; Ferreira, S.; Sobry, H.; Muharram, G.; Lucau-Danila, A.; Daniel, C. High-Dose Dietary Supplementation with Zinc Prevents Gut Inflammation: Investigation of the Role of Metallothioneins and beyond by Transcriptomic and Metagenomic Studies. *The FASEB Journal* **2020**, 34 (9), 12615–12633. <https://doi.org/10.1096/fj.202000562RR>.

Communications orales

Congrès International de la Société Française de Toxicologie Analytique – Flanders 2019 (Lille, Mai 2019). George, F.; Mahieux, S.; Beauval, N.; Houcke, I.; Neut, C.; Allorge, D.; Foligné, B.; Garat, A. Les bactéries alimentaires et intestinales au service de la bioremédiation des métaux lourds : détermination de leur capacité de capture par ICP-MS. Résumé publié : *Toxicologie Analytique et Clinique* **2019**, 31 (2, Supplement), S45–S46. <https://doi.org/10.1016/j.toxac.2019.03.062>.

Webinar de la Société Française de Microbiologie – Groupe de travail des Bactéries Lactiques - Weblactic, 2021 (Avril 2021). **George, F.**; Mahieux, S.; Daniel C.; Titécat, M.; Beauval, N.; Houcke, I.; Neut, C.; Allorge, D.; Borges, F.; Jan, G.; Foligné, B.; Garat, A. Evaluation des capacités de chélation du Pb(II), du Cd(II) et de l'Al(III) par des bactéries d'origine alimentaire et intestinales : approfondissement de la biodiversité pour limiter la toxicité des éléments traces métalliques. <https://www.sfm-microbiologie.org/2020/12/17/weblactic/>

Présentations annuelles lors de la Journée des Etudiants en Anglais de l'INFINITE U1286. Obtention du prix de la meilleure présentation orale au cours de la session du 17 mai 2019.

Journée des Nouveaux Entrants – INFINITE U1286. Novembre 2017.

Posters

19^{ème} Journée André Verbert - Colloque annuel des doctorants de l'école doctorale Biologie-Santé.

George, F.; Mahieux, S.; Beauval, N.; Houcke, I.; Neut, C.; Allorge, D.; Foligné, B.; Garat, A. Using food and intestinal bacteria for *in vivo* heavy metal bioremediation.

Article de Revue sur les bactéries lactiques



Occurrence and Dynamism of Lactic Acid Bacteria in Distinct Ecological Niches: A Multifaceted Functional Health Perspective

Fanny George¹, Catherine Daniel², Muriel Thomas³, Elisabeth Singer¹, Axel Guilbaud¹, Frédéric J. Tessier¹, Anne-Marie Revol-Junelles⁴, Frédéric Borges⁴ and Benoît Foligné^{1*}

¹ Université de Lille, Inserm, CHU Lille, U995 – LIRIC – Lille Inflammation Research International Center, Lille, France,

² Université de Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 – UMR 8204 – CILL – Center for Infection and Immunity of Lille, Lille, France, ³ Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France,

⁴ Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules, École Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires – Université de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Jan Kok,

University of Groningen, Netherlands

Reviewed by:

Cristian Botta,

Università degli Studi di Torino, Italy

Chiara Montanari,

Università degli Studi di Bologna, Italy

*Correspondence:

Benoît Foligné

benoit.foligne@univ-lille.fr

Specialty section:

This article was submitted to

Systems Microbiology,

a section of the journal

Frontiers in Microbiology

Received: 28 June 2018

Accepted: 12 November 2018

Published: 27 November 2018

Citation:

George F, Daniel C, Thomas M, Singer E, Guilbaud A, Tessier FJ, Revol-Junelles A-M, Borges F and Foligné B (2018) Occurrence and Dynamism of Lactic Acid Bacteria in Distinct Ecological Niches: A Multifaceted Functional Health Perspective. *Front. Microbiol.* 9:2899. doi: 10.3389/fmicb.2018.02899

Lactic acid bacteria (LAB) are representative members of multiple ecosystems on earth, displaying dynamic interactions within animal and plant kingdoms in respect with other microbes. This highly heterogeneous phylogenetic group has coevolved with plants, invertebrates, and vertebrates, establishing either mutualism, symbiosis, commensalism, or even parasitism-like behavior with their hosts. Depending on their location and environment conditions, LAB can be dominant or sometimes in minority within ecosystems. Whatever their origins and relative abundance in specific anatomic sites, LAB exhibit multifaceted ecological and functional properties. While some resident LAB permanently inhabit distinct animal mucosal cavities, others are provided by food and may transiently occupy the gastrointestinal tract. It is admitted that the overall gut microbiome has a deep impact on health and diseases. Here, we examined the presence and the physiological role of LAB in the healthy human and several animal microbiome. Moreover, we also highlighted some dysbiotic states and related consequences for health, considering both the resident and the so-called “transients” microorganisms. Whether LAB-related health effects act collectively or follow a strain-specificity dogma is also addressed. Besides the highly suggested contribution of LAB to interplay with immune, metabolic, and even brain-axis regulation, the possible involvement of LAB in xenobiotic detoxification processes and metal equilibrium is also tackled. Recent technological developments such as functional metagenomics, metabolomics, high-content screening and design *in vitro* and *in vivo* experimental models now open new horizons for LAB as markers applied for disease diagnosis, susceptibility, and follow-up. Moreover, identification of general and more specific molecular mechanisms based on antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, and detoxifying properties of LAB currently extends their selection and promising use, either as probiotics, in traditional and functional foods, for dedicated treatments and mostly for maintenance of normobiosis and homeostasis.

Keywords: lactic acid bacteria, gut microbiota, fermented food, probiotics, ecosystems, ecological niches

INTRODUCTION

A historical metabolic-based (and somewhat pleonasmic) consensus definition of lactic acid bacteria (LAB) is a broad group of bacteria characterized by the formation of lactic acid as a sole or main (over 50%) end product of carbohydrate utilization. However, LAB more strictly correspond to members of the order *Lactobacillales* from a taxonomic point of view. The important taxonomic and physiological diversity of LAB representatives is, however, not convenient when addressing specific ecological niches and roles and applications of LAB. Indeed, LAB adapt to various conditions and change their metabolism accordingly; they cover a varied range of genera including species of lactobacilli, enterococci, lactococci, pediococci, streptococci, tetragenococci, vagococci, leuconostocs, oenococci, carnobacteria, and weissella. The LAB thus constitutes a very heterogeneous group and are often misleadingly circumscribed to lactobacilli only. In contrast, other microbes used in the making of fermented dairy products or claimed as probiotics such as bifidobacteria, propionibacteria, and even brevibacteria, belonging to the anaerobic actinomycetales, are falsely included or assimilated within this group. This is partly due to their overlapping habitat or common properties together with unclear species identity.

Recent efforts have been undertaken to identify lactobacilli and related species (Sun et al., 2015). From eighty identified *Lactobacillus* species, 15 years ago (Satokari et al., 2003), we now reach to more than 200, with continuous new discoveries, e.g., *Lactobacillus timonensis* (Afouda et al., 2017) or *Lactobacillus metriopecterae* (Chiba et al., 2018) due to next-generation sequencing (NGS), clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-based methods (Sun et al., 2015), and culturomics (Lagier et al., 2015). This has justified the proposal for a reclassification of the genus (Claesson et al., 2008). According to the last taxonomic update of the lactobacilli, a dozen clades have been recently organized (Salveti et al., 2012). The current knowledge on evolution of the genus *Lactobacillus*, its environmental niches, and the degree of host specificity was recently completed (Duar et al., 2017). Ecological differentiation of the genus *Carnobacterium* was recently established based on comparative genomic analysis (Iskandar et al., 2017).

The genus *Enterococcus* encompasses more than 50 species that can also be found in diverse environments, from the soil to the intestine of animals and humans, including the hospital environment, which provide concerns (Dubin and Pamer, 2014). In addition, enterococci are present as spoilage microflora of processed meats, but, on the other hand, they are important for aroma development and ripening of traditional products such as certain cheeses and sausages (Franz et al., 2003). Depending on their origins and evolution (Lebreton et al., 2013), they may act as both commensals and pathogens, and strains are consequently of clinical importance, harboring virulence factors (Ali et al., 2017) as well as possibly being used as probiotics (Holzapfel et al., 2018).

The various genera, species and even strains of LAB inhabit and cope with specific environments in order to exert dedicated

or multiple specific functions according to their structural determinants and/or metabolic pathways. With the exception of enterococci as opportunistic pathogens and the case of pathogenic streptococci, there are only a few reported cases of bacteremia due to LAB (Goldstein et al., 2015; Kamboj et al., 2015). The LAB are regarded as generally recognized as safe (GRAS) because of their ubiquitous use in food and their unique role in the healthy microflora of human mucosal surfaces. To date, 50 LAB strains have obtained the qualified presumption of safety (QPS) status by the European Food Safety Agency (Ricci et al., 2017), again, comprising mostly lactobacilli spp. ($n = 37$). However, enterococci have been classified in risk group 2 in the European Directive 93/88.

The LAB greatly differ in morphology, optimal growth and tolerance temperature, salt and pH tolerance, metabolism, and surface and secreted molecule (Lebeer et al., 2010; Pessione, 2012; Gänzle, 2015). They may secrete effector proteins, produce exopolysaccharides (EPS) and generate biofilms, or adhere on abiotic and/or biologic surfaces, depending upon genera, species, or strain. Accordingly, the origins, quantities, the diversity, and abundances of LAB strains in complex ecosystems may greatly impact on the intended effect(s), product(s), and functionality. As a striking example of broad effects, the presence of psychrotrophic *Lactobacillus* spp. as the prevailing spoilage organisms in packaged cold-stored meat or fish products is unwanted (Andreevskaya et al., 2018). In contrast, dominance of only a few *Lactobacillus* species inhabiting human vaginal cavities is essential to maintain a low microbial diversity and prevent further vaginosis (Borges et al., 2014; Vanechoutte, 2017b). Consequently, LAB, in general, and lactobacilli, in particular, cannot be considered as a whole, and have to be stratified depending on their intrinsic characteristics and potential applications. Hence, up to 25 species are defined as fructophilic LAB that inhabit fructose-rich niches in nature, e.g., flowers, fruits, and fermented foods. These LAB can also be isolated from the gut of bees and flies (Endo, 2012), and the latter have coevolved to determine microbe–host mutualism (Matos and Leulier, 2014). A motile phenotype has been characterized in nearly 15 distinct *Lactobacillus* species, while motility genes have also been detected in other closely related strains. This will both contribute to select geographical ecological niches and, due to flagellin signalization, to sustain the immune potential of such bacteria (Cousin et al., 2015).

It has been recognized for a long time that LAB are fascinating and useful bacteria (Tannock, 2004) and, now, recent advances in technologies allow addressing the specific mechanisms of the important bacteria–host interactions in appropriate models. The uses of LAB as biotherapeutic agents and probiotics are based on multiple molecules and modes of action that are currently deciphered. Here, we present a short overview dealing with the overall occurrence of LAB in the environment and some of their contributions to health, focusing on strain-dependent effects together with consideration on individual hosts and experimental models.

LAB IN THE ENVIRONMENT AND RAW AND FERMENTED FOODS

The LAB can be found nearly everywhere although their total load and relative abundance in microbial ecosystems are extremely diverse and depend on the specific environment. The selective pressure exerted by these environments is a key driver in the genomic diversity among LAB strains derived from distinct habitats (McAuliffe, 2018). LAB have been identified in Japanese lakes, with viable cell counts ranging from 1 to 3 log per ml, with a clear seasonal variation (Yanagida et al., 2007). LAB could also be isolated from soils following enrichment protocols (Chen et al., 2005). Although soils do not contain large amounts of LAB, they are somewhat more abundant on the plant–soil interface such as the rhizosphere of some trees and comestible fungi. Some of the strains obtained from these niches showed antimicrobial properties (Fhoula et al., 2013). The abundance and diversity of LAB in soils greatly depend on carbon-richness, which is, e.g., greater under fruit-trees and in soils associated with anthropic activities or free-range farming, and after the use of manure. Notably, many halo-tolerant LAB, known to be able to survive and even grow in dry environments, can be recovered from soils when soil acidity may contribute too. It is interesting to note that LAB are also used in agriculture, as biofertilizers, safe biocontrol agents for bacterial and fungal phytopathogens, regulators of abiotic plant stress, and biostimulant agents to ameliorate plant growth (recently reviewed by Lamont et al., 2017). Understanding the phytomicrobiome, including the role of LAB therein is an emerging field with great potential to mitigate plant stress and promote plant resistance and production.

The LAB only represent a subdominant part of raw vegetables and fruits microorganisms (2 and 4 log cfu per g.), while the microbial autochthonous population varies between 5 and 7 log cfu per g. (Di Cagno et al., 2013); hetero-fermentative and homo-fermentative species belonging to *Leuconostoc*, (mostly *L. plantarum*), *Weissella*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* genera are those most frequently identified as epiphytes within the microbiota, depending on the plant species. We also should consider the low but relevant endophyte LAB representatives when regarding adaptation of LAB to plant niches. Indeed, the capacity to adapt to the intrinsic features of the raw plant matrices and persist stably as endophytes throughout plant phenological stages represent additional criteria for selecting robust LAB candidates (Filannino et al., 2018). Some LAB found in bakery sourdough are there partly due to contaminating flour and may originate from milling, representing a part of the endophytic microbial community of wheat at very low levels. Moreover, LAB diversity in sourdoughs may also originate from external layers of wheat plant organs (epiphytic) and the bakery environment (the bakers, insects, and nuisance species animals) (Minervini et al., 2015). The ability of LAB to produce organic acids and other antimicrobial substances has made them essential in the preservation of plant-based foods while they also are the most important microbes promoting significant positive changes in healthy aspects of plant foods. Their metabolism throughout fermentation contributes to lowering some toxic

and antinutritional factors and promoting bioavailable bioactive compounds (Di Cagno et al., 2013; Marco et al., 2017; Filannino et al., 2018). Following either spontaneous fermentation or after intentional inoculation of food products with LAB as starters, the final LAB load in plant products can reach 8 to 9 log per g. Such a high concentration of LAB contributes to the biocontrol of pathogens (Gram-negative bacteria, *Listeria monocytogenes*) in food as well as to their possible use in probiotic/functional food.

The natural origin of LAB used in traditional fermented foods, such as sauerkraut, pickles, cheese, sausage, fish, fish- and soy-sauce, sourdough bread, and animal silage, is the corresponding matrix (fruits, cereals, milk, and animal farm environment) or the associated (wooden) material (Lortal et al., 2014). A plant-based origin for dairy lactococci was nicely demonstrated using genome evolution studies (McAuliffe, 2018). Starters and ferments have then been isolated, selected, and domesticated over past centuries to control the fermentation processes and standardize the taste and quality of the final products. The final count of LAB in fermented products is highly diverse and ranges from 4 to 5 log to over 9 log of bacteria, depending on product types, fermentation dynamics, and the overall microbial ecology of the products. Moreover, the abundance of other non-LAB, yeasts, and molds in these complex ecosystems, especially in cheeses, needs to be considered. The microbial diversity of fermented food together with some functional properties, including the contribution of some LAB therein, has been extensively reviewed elsewhere (Tamang et al., 2016a,b; Linares et al., 2017; Marco et al., 2017). The health benefits of fermented foods and the added value of ingesting LAB in order to either prevent or treat some specific diseases is now generally accepted and beyond discussion. Regardless of their traditional or industrial origins, fermented foods are active sources of LAB, among other microbes, that will enter the digestive tract and possibly exert a positive influence (and even a negative one) on the host.

OCCURRENCE OF LAB IN MUCOSAL NICHES

The Human Vaginal Tract as a Unique Example of LAB Dominance and Functionality

Dominance of LAB in the vaginal niche is a characteristic of healthy women, reaching from 70 to up to 90% of resident bacteria, whereas LAB colonization of the genital tract of other mammal species, including primates, is anecdotic and generally below 1% of the relative abundance (Miller et al., 2016). This is unique in humans where vaginal fluid generally contains 7 to 8 log of lactobacilli per mL, represented by a dozen or so species most frequently found (Borges et al., 2014). However, the normal vaginal flora is usually dominated by one or two out of the major species of lactobacilli (Vanechoutte, 2017b). In addition, occurrence of other rare *Lactobacillus* species and other LAB representatives such as *Pediococcus acidilactici*, *Weissella* spp. (*W. kimchi*, *W. viridescens*), *Streptococcus anginosus*, and *Leuconostoc mesenteroides* has also been reported. These

observations greatly depend on ethnic groups, individuals, and time, according to pregnancy or menopausal status (Borges et al., 2014). Notably, not all *Lactobacillus*-deficient vaginal microbiotas are adverse (Doyle et al., 2018). The main benefits of lactobacilli in the vaginal sphere are essentially that they have anti-infectious properties, and can prevent and target bacterial vaginosis, vaginal candidiasis, and sexually transmitted virus and bacterial pathogens. The normobiosis of the vaginal microbial community is based on low pH maintenance (ranging from 3.5 to 4) due to lactate production following glycogen consumption, which is unique in humans, and not necessarily in other animals. Another key factor is hydrogen peroxide production. While 95% of lactobacilli of vaginal origin from healthy women are H₂O₂-producers, this proportion can drop to 6–20% in the context of vaginosis. Moreover, dominance of *L. iners*, a non-H₂O₂ producer, has been associated with poor protection and even a risk-factor in vaginal dysbiosis (Vanechoutte, 2017a). However, the specific role of *L. iners*, which is uncultivable in standard LAB culture media and unable to produce D-lactate, is still on debate (Petrova et al., 2017). Finally, bacteriocin production is also involved in direct killing of microorganisms by lactobacilli in the vagina although most vaginal LAB isolates do not exhibit bactericidal activity (Spurbeck and Arvidson, 2011). Anyway, this production is an optional issue in selecting appropriate strains and sustaining the role of probiotics in maintaining vaginal health (Borges et al., 2014). As a more indirect mechanism, a recent study has demonstrated that the overall *Lactobacillus*-associated anti-inflammatory properties in the vaginal mucosa could contribute to lower HIV infectiveness (Gosmann et al., 2017). Collectively, only few LAB species are adapted to dominate the human vaginal cavity in order to preserve health.

Heterogeneity of LAB Abundance Within the Gut Microbiota

Very recently, Heeney et al. (2018) raised the question of the importance of *Lactobacillus* in the intestine of mammals by reviewing the occurrence of LAB in the gastrointestinal tract of distinct vertebrates. In contrast to rodents where LAB can represent 20% to up to 60% of all bacteria, the estimated proportion of LAB in the human proximal small intestine is always subdominant (6%), while their relative abundance in the colon is mostly below 0.5% or non-detectable. LAB have also been detected in substantial amounts in the stomach of humans although the actual numbers are subject to huge variations depending on individuals and their health status, the methodology used, and the type of samples. Depending on genetic backgrounds, the gut microbiota of laboratory mice is highly diverse and the proportion of LAB can range from undetectable to near 100%, ranging from 4.7 to 10.6 log (Friswell et al., 2010; Nguyen et al., 2015). The gut microbiome of wild wood mice comprises an average of 30% of *Lactobacillales*, although it dramatically changes with the seasons. Indeed, the proportion of *Lactobacillus* spp. ranges from 60% in spring to 20% in the fall (Maurice et al., 2015). The abundance of LAB in the intestinal microbiota of laboratory mice is highly influenced by the diet and can

range from 10% *Lactobacillales* on a normal fiber control diet to 0.5% with low-fiber diet and 40% with a high-fiber diet (Trompette et al., 2014). Similarly, LAB abundances also vary according to circadian rhythm disturbances (Voigt et al., 2014).

The mode of delivery (vaginal versus C-section) in humans is important to allow, respectively, high or low levels of *Lactobacillales* in babies. These differences persist during the first 2 years of life and progressively disappear (Dominguez-Bello et al., 2010). Indeed, lactobacilli and enterococci are first colonizers and dominant bacteria, then become subdominant at toddler and adult ages. A metagenomic study identified nearly 60 distinct species of lactobacilli in human fecal samples, not exceeding 0.04% of all bacteria present, corresponding to near 8.5 log cell per g. from an average bacterial load of 12 log (Rossi et al., 2016). Within this diversity, one or two major species (*L. rhamnosus* and *L. acidophilus*) were estimated at 8 log. Of the six most represented species, those estimated from 7.5 log were identified as *L. rhamnosus*, *L. ruminis*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. casei*, and *L. plantarum*, while others were detected below 5 log cell per g., close to the detection threshold. In this study, the abundance of enterococci was similar to that of lactobacilli, but commensal streptococci were two to five times more abundant. Turroni et al. (2014) reported dominance of *L. gasseri*, *L. casei*, *L. namurensis*, *L. rogosa*, and *L. murinus* in human fecal samples. Clearly, proportions of LAB and even *Lactobacillus* species are highly diverse and vary between individuals (Booijink et al., 2010). This may explain difficulties at comparing microbiome data from healthy controls and patients with distinct pathologies aiming at uncovering a possible protective or even deleterious general role of lactobacilli. Many studies investigating the role of the human gut microbiota in distinct immune-mediated inflammatory diseases have reported either increased, decreased, or unchanged levels of lactobacilli (Forbes et al., 2016; Heeney et al., 2018). All in all, no consistent marker for any pathology or a healthy state is simply defined by a specific proportion of *Lactobacillus*, or even based on the follow-up of the *Lactobacillus* load for an individual in time. Interestingly, gut remodeling due to a restrictive surgery and leading to short bowel syndrome was accompanied by enrichment of lactobacilli (Joly et al., 2010; Boccia et al., 2017), which may explain the D-lactate acidosis in some subgroups of patients (Joly et al., 2010; Mayeur et al., 2016; Boccia et al., 2017). The in lactobacilli-enriched microbiota in patients suffering from short bowel syndrome may also favor energy recovery occurring after resection (Gillard et al., 2017). The abundance of enterococci in the human gut, mostly *E. faecium* and *E. faecalis*, is estimated between 4 and 6 log bacteria per g. wet weight (Layton et al., 2010). It, thus, represents nearly 1% of the relative abundance, which is 10–100 times higher than that of lactobacilli. Although commensal LAB are somewhat subdominant, they clearly play a role in gut physiology with consequences on health and qualitative (species and strain specificity) rather than quantitative aspects (genera and family abundance) should be considered. The interplay between LAB and non-LAB within the gut has not been completely revealed yet. For instance, several authors have

highlighted the possible indirect role of LAB in increasing the butyrate content in the feces. This capability is attributed to an initial cleavage of fibers in the large intestine to more fermentable compounds, which are then further converted to butyrate by butyrogenic non-LAB present. Moreover, exogenous LAB, sourced after oral administration of fermented foods or dietary supplements, may reach numbers similar to those of commensals (0.1–1% of the total microbiota present in the gastrointestinal tract, so 5–8 log per g.), depending on dietary habits and geographic areas (Plé et al., 2015). Such transitory or “visiting” living microorganisms, also named pseudocommensals (Rook, 2013) or transients, cannot durably colonize the host. However, provided these bacteria are regularly or even occasionally ingested in sufficient amounts, they can act as symbionts or pathobionts, modulate the gut microbiota, and exert various health effects.

The Lung as an Emerging Example of LAB Occurrence and Functionality?

The exploration of the microbiota in the lung is in its infancy when compared with the microbiomes from the gut or the vaginal cavity. Using 16S metagenomics, the microbiota of the respiratory tract has been described since 2010; it is mainly made up by two phyla (Firmicutes and Bacteroidetes) in humans and four phyla (Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, and Actinobacteria) in mice (Singh et al., 2017). The load of lung microbiota is estimated to reach around 10^3 – 10^4 cultivable bacteria per gram of lung homogenates in mice (Remot et al., 2017). In humans, it has been estimated as a mean of 3 log bacterial genomes per cm^2 surface in the upper lobe (Hilty et al., 2010). The lung microbiota plays a key role in promoting tolerance (Gollwitzer et al., 2014) and is a determinant of maintenance of homeostasis. It remains difficult to define a healthy lung microbiota as of yet, due to its high intervariability as a function of age, diet, or environment, but LAB (*Streptococcus*, *Lactobacillus*, and *Enterococcus*) are prominent members and seem to be actors of respiratory symbiosis and health. As an example, the presence of *Enterococcus faecalis* decreases with the severity of asthma in the human lung microbiota (Turturice et al., 2017) and the decrease of the bacteria improves the outcomes of asthma in a preclinical mouse model (Remot et al., 2017). Nasal administration of *Lactobacillus rhamnosus* GG protects against influenza virus infection (Harata et al., 2010) and oral supplementation of *Lactobacillus* spp also modifies the lung ecosystem. Overall, these data indicate that LAB are major members of lung microbiota and might be useful in future preventive strategies or new therapeutics for respiratory health.

REGARDLESS OF THEIR ORIGIN, LAB CAN EXHIBIT MULTIFACETED FUNCTIONAL PROPERTIES

Immune Properties

Anti-inflammatory properties of LAB have been extensively studied in rodents and to a lesser extent in humans

(Hevia et al., 2015; Papadimitriou et al., 2015). This is attested by many studies sustaining the protective role of commensal LAB and the benefits brought by exogenous LAB through nutritional and/or probiotic interventions. The overall anti-inflammatory value of LAB is also evidenced by the rarefaction of lactobacilli in the gut of inflammatory bowel disease patients. Moreover, the drop of lactobacilli observed in the fecal microbiota of aging populations can be related to the low-grade inflammation theory, i.e., ‘inflamm-aging’ and frailty (van Tongeren et al., 2005; Franceschi et al., 2017). Recently, it was shown that diet-induced exacerbation of experimental colitis is associated with a reduction in *Lactobacillus* sp. and a lower production of protective short-chain fatty acids, including butyrate (Miranda et al., 2018). Nevertheless, whether the overall rate of LAB or even a minimal threshold of lactobacilli may or may not represent an indicator for health is not yet clear. The prevalence and richness of *Lactobacillales* and lactobacilli may either increase or decrease depending on immune disease types and studies (Forbes et al., 2016; Heeney et al., 2018), and such changes can be linked to causal events or adaptive processes to counteract the injury. Again, besides genus and species, also strain-level attributes matter when considering immunomodulatory properties of LAB (Sanders, 2007). This has been well documented during the last decades, showing anti-inflammatory probiotic properties of specific lactobacilli based on multiple distinct mechanisms of reducing colitis symptoms in mice (Sanders et al., 2018). For example (non-exhaustive), a *L. plantarum* strain was shown to be beneficial against inflammation because of a specific teichoic acid structure (Grangette et al., 2005), while the anti-inflammatory effect of a strain of *L. salivarius* was dependent on peptidoglycan (Macho Fernandez et al., 2011). In contrast, the alleviation of colitis was attributed to S-layer proteins of *L. acidophilus* (Konstantinov et al., 2008), pili for a *L. rhamnosus* strain (Lebeer et al., 2012), and EPS for another *L. plantarum* (Górska et al., 2014). In line with these observations, the structurally different EPS from resident lactobacilli generate different immune responses by dendritic cells while, upon gut inflammation, specific bacterial molecular motifs are absent from lactobacilli isolated from IBD (Górska et al., 2016), providing tools for further application based on strain selection (Oleksy and Klewicka, 2018). The positive role of H_2O_2 production to lower inflammation has been reported for *L. crispatus* and *L. rhamnosus* (Voltan et al., 2008; Lin et al., 2009). The colitis alleviating property of *L. bulgaricus* was related to activation of the aryl hydrocarbon receptor pathway in colon cells (Takamura et al., 2011), in line, the control of inflammation by an *L. reuteri* intervention was associated to the production of histamine followed by activation of a host epithelial cell receptor (Gao et al., 2015). An *L. casei* strain inhibited the secretion of the pro-inflammatory mediator IP-10 protein at the post-translational level (Hoermannsperger et al., 2009); this inhibition is based on the role of a specific secreted protein by the bacteria (von Schillde et al., 2012). Specific bacterial DNA motifs may also drive some of the immune-stimulatory effects in a toll-like receptor 9-dependent manner (Iliev et al., 2008). Interestingly, distinct immunological activities through TLR5-signaling

caused by flagellins isolated from motile lactobacilli presume a consequence of adaptation to commensalism (Kajikawa et al., 2016). Pro-inflammatory LAB, i.e., *L. crispatus*, were inconsistently reported in murine models of colitis (Zhou et al., 2012). Given that these observations are rare, one has to keep in mind that such undesirable (and embarrassing) results are difficult to publish and that they may be underestimated. LAB other than lactobacilli can also exert immune effects and strain-dependent impact on the release of pro-inflammatory cytokines and colitis. Strain diversity in such anti-inflammatory properties has been reported for food-derived pediococci and oenococci (Foligné et al., 2010), carnobacteria (Rahman et al., 2014), and enterococci (Wang et al., 2014). Notably, several strains of *Enterococcus* spp. are marketed as probiotics, for use in many health purposes both in humans and pets, alone or in combination with other LAB and/or bifidobacteria but most of the *Enterococcus* species are believed to have no prominent beneficial effect on inflammation as well as on the overall human health.

No single and unique mechanism of anti-inflammatory effects of LAB can be generalized. The overall combination of anti-inflammatory and anti-oxidative properties with the occurrence of some immune-stimulatory signals of a single LAB strain has to be integrated by the host. Moreover, when interpreting the host's health, one also should consider the interplay of these specific molecular players with those of other (non-)LAB strains from the microbiota. Consequently, the anticipated effects of a promising strain can either be boosted or diluted, depending on its microbial microenvironment in the gut. In addition, the contribution of the matrix should not be neglected (Burgain et al., 2014; Lee et al., 2015). Together with a high variability in host immune reactivity, it seems difficult to fully predict the performance of individual LAB strains. It is essential to screen LAB strains with valuable properties (Foligné et al., 2013; Papadimitriou et al., 2015), but integrative endpoints are necessary to fully characterize the consequences of LAB for health; relevant anti-inflammatory strain selection should thus be based on specific mechanisms and how they may interplay within the microbiota (Lebeer et al., 2018).

Metabolic Properties

Clear links have been established between gut microbiota, metabolism, and the nutritional status of distinct animals, including farm animals, whose growth performance was empirically boosted either by antibiotics or probiotics for several decades. The key role of gut microbes in the metabolic physiology of the host, throughout evolution, has been demonstrated in *Drosophila* (Leulier and Royet, 2009) in fish (Egerton et al., 2018), in rodents and humans (Ley et al., 2006; Gérard, 2016). Molecular mechanisms involved multiple signaling pathways such as microbial production of short-chain fatty acids, the control of epithelial integrity (and endotoxemia), and modulation of chronic inflammation, which has been reviewed elsewhere (Maruvada et al., 2017; Dao and Clément, 2018). Microbiota-derived metabolites can also interplay with the regulation of appetite and satiety. They act particularly on intestinal food intake mediators likely GLP1, leptin, and ghrelin. In mammals,

disruption of the homeostasis of gut microbiota (dysbiosis), resulting from an imbalance of bacterial strains, may induce physio-pathological processes leading to chronic obesity or metabolic disorders such as type 2 diabetes or metabolic syndromes (Carding et al., 2015).

Gnotobiotic rodents have been used to study the health effects on germ-free (axenic) animals of treatment with specific bacterial strains. The glycolytic activity of *Streptococcus thermophilus* is improved once inside the digestive tract of mono-associated rats (Rul et al., 2011). Colonization of the gut of germ-free mice by microbiota from obese mice significantly increases their total body fat compared with colonization by microbiota from lean mice (Turnbaugh et al., 2006). In addition, inoculation of both obese mice and humans with microbiota from lean mice or humans, respectively, improves symptoms of metabolic syndrome (Vrieze et al., 2012; Kulecka et al., 2016; Ji et al., 2018). Some *Lactobacillus* species are associated with weight gain, while others are associated with protection against obesity (Drissi et al., 2014). Compared to lean patients with a normal body mass index, abundance of lactobacilli was higher in obese and lower in anorexic individuals (Ley et al., 2005; Armougom et al., 2009). In contrast, a recent study established a relationship between the high oral *Lactobacillus* counts and protection to further weight gain, while a lack or a low level of oral lactobacilli may increase the risk of obesity (Rosing et al., 2017). Higher proportions of lactobacilli were related with type 2-diabetes (Larsen et al., 2010; Karlsson et al., 2013). Moreover, some lactobacilli were also reported to limit undernutrition and to have growth-promoting effects in mice (Schwarzer et al., 2016) while a strain of *L. reuteri* could contribute to preventing cachexia (Bindels et al., 2016). Data dealing with the occurrence of *Lactobacillus* spp. in obesity and type 2-diabetes are thus inconsistent, which is most probably related to their low and variable quantity in the gut microbiota. Comparative genomic analyses have shown that *Lactobacillus* species linked to weight-loss had specific arsenals of genes associated with anti-microbial activities such as bacteriocins (Drissi et al., 2014). In contrast, weight gain-associated *Lactobacillus* spp. harbored enzymes involved in lipid metabolism. Besides the species level, the importance of properties at the strain level was revealed using interventions in experimental rodent models.

Significant research efforts over the recent decades have been devoted to the development of effective treatments for obesity and metabolic disorders, using probiotics to mitigate dysbiosis and its impact on metabolism. Several studies have shown that ingestion of LAB by rodents reduced weight gain and improved the metabolic profile (blood glucose level, insulin, leptin), oxidative stress, and hepatic inflammation in various models such as mice fed with a high fat diet (HFD) (Alard et al., 2016; Park et al., 2017); *Lepr^{db/db}* mice (lacking the functional, full-length Ob-Rb leptin receptor) (Yun et al., 2009), streptozotocin (STZ)-induced diabetic mice fed an HFD (Pei et al., 2014), STZ-diabetic rats (Tabuchi et al., 2003), and rats fed with a diet high in fructose (Hsieh et al., 2013). These experiments mostly underlined the role of *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. gasseri*, *L. casei*, *L. mali*, *L. fermentum*, and *L. reuteri* strains alone or in combination with other strains. Again, not all *Lactobacilli* are able to control

obesity and adiposity and some, i.e., an *L. salivarius* strain known as a probiotic for anti-inflammatory properties in mice, could not alleviate diet-induced obesity and insulin resistance, while a strain of *L. rhamnosus* did (Alard et al., 2016). Similar results have also been observed in clinical trials. For example, glycemia and cholesterol levels were reduced in elderly subjects after a month of daily consumption of a combination of *L. acidophilus* and *B. bifidum* strains (Moroti et al., 2012), while a reduction was observed of oxidative stress and glycemia levels in type-2 diabetes patients after 6 weeks of daily consumption of a probiotic dairy product containing *L. acidophilus* and *B. lactis* (Ejtahed et al., 2012). The beneficial effects of various species of *Lactobacilli* on obesity throughout clinical interventions have not been demonstrated nor reviewed yet (Crovesy et al., 2017). One possible explanation of metabolic disorders alleviation is that probiotics, and especially LAB, could reduce the absorption and conversion of food into useable energy and subsequent fat storage, resulting in anti-obesity, anti-inflammatory, and anti-diabetic effects in mice and humans (Kerry et al., 2018). The current molecular hypothesis of anti-obesity mechanisms involves the specific role of short-chain fatty acids and the host cell receptors FFAR2 and FFAR3, the contribution of bile-salt hydrolases from LAB, and further bile signature signaling of FXR and TGR5 receptors as well as LAB metabolites as antagonists of AhR (Lamas et al., 2016). However, no clear explanation is achieved yet.

In addition, LAB strains that either lower pathogen or even pathobiont numbers, those that strengthen the gut barrier and reduce LPS-endotoxemia, and the anti-inflammatory strains are also valuable candidates against obesity.

Lactic acid bacteria are also able to produce conjugated linoleic acids, gamma-aminobutyric acid (GABA) and may contribute to signal the neuroendocrine and vascular systems. More studies are necessary to determine the best strains, optimal dose, and treatment time to achieve beneficial outcomes for obesity, type-2 diabetes, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and decipher the corresponding mechanism(s). Collectively, those data should shed light on selected probiotic strains as important tools to prevent and treat patients with metabolic disorders and cardiovascular diseases.

Antimicrobial Properties

Besides the widely known lactic acid and H₂O₂-mediated anti-bacterial, anti-viral, and anti-fungal properties of LAB, specific bacteriocin-based mechanisms can control bacterial growth in distinct environments. Bacteriocins are ribosomally synthesized peptides or proteins that exhibit bactericidal or bacteriostatic activities (Leroy and De Vuyst, 2004; Cotter et al., 2005). The classification of bacteriocins is a long-term matter of debate. Lately, a large scientific consortium proposed a new classification in which post-translationally modified bacteriocins of less than 10 kDa are considered as Ribosomally synthesized and Post-translationally modified Peptides (RiPPs) (Arnison et al., 2013). This new classification was slightly modified to embrace all bacteriocins leading to three classes, where class I are RiPPs, class II are unmodified bacteriocins (less than 10 kDa), and the class III are large bacteriocins (Alvarez-Sieiro et al., 2016).

Bacteriocins are found in almost every examined taxa. Their likely ubiquitous nature suggests they play a major role in shaping bacterial communities: they may serve as anticompetitors preventing invasion of a bacterium into an established community and could reciprocally allow a bacterium to invade a community (Riley and Wertz, 2002). Intuitively, their activity should lead to diversity reduction; however, experimental and modeling data suggest that under certain circumstances, bacteriocin production can promote diversity providing that taxonomic diversity is mirrored by bacteriocin-encoding gene diversity (Abrudan et al., 2012).

There are three major already established or future applications of bacteriocins. They can be used as biopreservative agents, as probiotic-promoting factors, and as antibiotics. Although two bacteriocins, nisin and pediocin, are allowed as food preservatives, bacteriocins are mainly indirectly used through producer strains. These strains are included into ready-to-eat food in order to produce bacteriocins *in situ* and are mainly used to target *Listeria monocytogenes* (Alvarez-Sieiro et al., 2016). Bacteriocin-producing LAB are also promising probiotic candidates for humans and animals (Dobson et al., 2012). Proof of concept was demonstrated by showing that bacteriocin production by *L. salivarius* UCC118 allows protecting mice from *L. monocytogenes* infection (Corr et al., 2007). Several studies revealed that bacteriocin production results in changes in the gut microbiota structures (Murphy et al., 2013; Umu et al., 2016) leading to the idea of using bacteriocins as tools for targeted manipulation of gut microbiota (Murphy et al., 2013).

Besides biopreservation and probiotic-promoting factors, bacteriocins are considered as a means to fight against emerging multidrug resistant pathogens (Cotter et al., 2013). A promising strategy consists in combining the use of bacteriocin with other antimicrobials to reduce the frequency of resistant variants appearing and/or to increase the antimicrobial potency (Mathur et al., 2017).

All these possible applications fuel active research, aiming at identifying new bacteriocins. Despite the tremendous literature describing new bacteriocins, new ones with interesting novel structures and unique activity are still being discovered. The challenge is now to design strategies that allow to avoid already reported bacteriocins. The traditional approach, isolating a strain exhibiting antagonistic activity followed by purification of the active compound prior characterization, is time-consuming, expensive, and tedious. Therefore, new workflows were developed that include steps dedicated to assess the novelty of bacteriocin candidates. One strategy combines liquid chromatography/mass spectrometry with principal component analyses of the antimicrobial spectrum of each bacteriocin-producing LAB strain (Perez et al., 2014). There are also *in silico* strategies based on genome mining that allow identifying candidate genes specifying putative bacteriocin proteins with novel structures (Collins et al., 2017).

Detoxifying Properties of LAB

The LAB, among other bacteria, have been suggested as tools for detoxification of several xenobiotics and pollutants such as

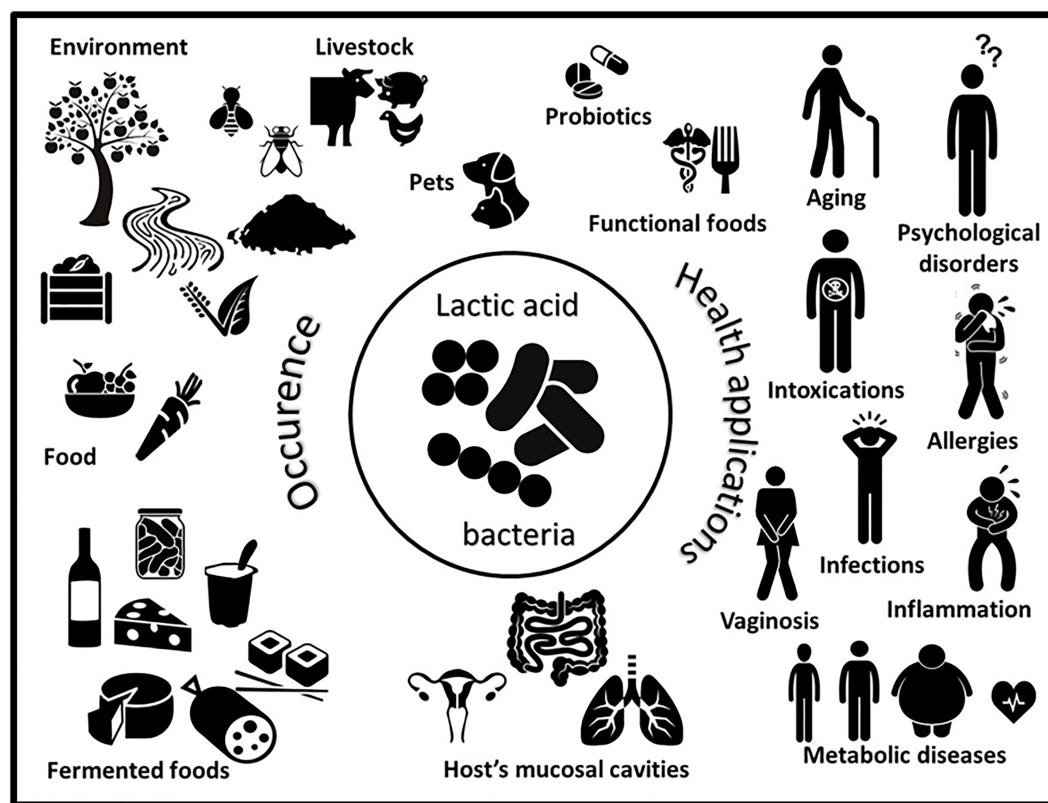


FIGURE 1 | Schematic representation of the worldwide occurrence (left) and multiple health applications (right) of lactic acid bacteria.

pesticides, toxins, and heavy metals. Whereas bioremediation is actively used in the environmental industry for many years, *in vivo* applications of LAB to reduce contaminant bioavailability are only in the early stages of development. Proof of concept has already been established, however, using distinct animal models and pilot clinical studies (Trinder et al., 2015; Wang Y.S. et al., 2016). For example, specific *Lactobacillus* spp. and *Leuconostoc* isolated from kimchi possessing an organophosphorus hydrolase gene were able to degrade pesticides such as chlorpyrifos and parathion (Islam et al., 2010). In this context, resistance to insecticides (chlorpyrifos, fipronil) was associated with the presence of *Lactobacillales* in the midgut of insects (Xia et al., 2013). Recent data support the use of an *L. rhamnosus* strain to reduce absorption and subsequent toxicity of organophosphate pesticide and neonicotinoid to *Drosophila melanogaster* (Trinder et al., 2016; Daisley et al., 2017, 2018). These are encouraging results that might be helpful in the fight against the current worldwide environmental threat of bees dying from these toxic compounds. They also suggest further examining the use of supplements for human, livestock, or apiary foods with selected probiotic microorganisms.

Lactic acid bacteria have also shown potential in mitigating toxic effects of distinct mycotoxins such as aflatoxins (B1, F1 and M1), patulin, ochratoxin A, and deoxinivalenol in food and feed (Fuchs et al., 2008; Ahlberg et al., 2015). Certain *Pediococcus*

spp. have mycotoxin adsorbing and degrading properties (Martinez et al., 2017). Reducing aflatoxin bioavailability was reported in rats (Hernandez-Mendoza et al., 2011; Nikbakht Nasrabadi et al., 2013) and in mice (Jebali et al., 2015), but yet no clinical data are available on the use of LAB as detoxifying probiotics in humans. Other toxic substances can be handled by LAB. Acrylamide-binding ability by LAB was found to be both concentration- and strain-dependent, *in vitro* (Serrano-Nino et al., 2014) as well as in a gastric digestion stimulator (Rivas-Jimenez et al., 2016); the binding was mostly based on teichoic acid properties of specific strains. These results are promising for further actions and research to reduce exposure and bioavailability of such carcinogenic compounds.

Bioremediation of heavy metal (HM) and other hazardous and toxic metals such as chromium (CrVI) and aluminum, and, to a lesser extent, copper and cobalt, is challenging. The bioremediation is based on specific capacities of microorganisms to immobilize and/or inactivate pollutants by various passive (biosorption, complexation) or active transport (internalization, efflux/uptake ratio) mechanisms, including distinct bioprocesses (oxido-reduction, demethylation, e.g., for CH₃-mercury) to lower HM bioavailability. Efforts have mostly focused on LAB and related species, and these have shown that selected lactobacilli (and bifidobacteria) can sequester lead (Pb) and cadmium (Cd) divalent cations and mercury (Hg) salts

(Ibrahim et al., 2006; Halttunen et al., 2007, 2008; Bhakta et al., 2012). A key point is the huge variations in binding capacity among LAB species and even strains (Kinoshita et al., 2013). This variability is partly caused by the high diversity of ionisable compounds on the surface of Gram-positive bacteria (Lebeer et al., 2010). For example, EPS and teichoic acids comprise negatively charged groups (hydroxyl, carboxyl, phosphate) as potential ligands for divalent metal cations (such as Pb^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+}). In contrast, peptidoglycan and a mosaic of specific surface proteins (e.g., S-layer proteins) have positive charges, which can explain affinity toward arsenate $As(V)$ (Schär-Zammaretti and Ubbink, 2003). Since the last decade, bioremediation of HMs and tolerance of humans to HMs through microbial processes using food-grade microorganisms have been highlighted (Monachese et al., 2012; Kumar et al., 2018). This concept can also be applied *in vivo* 'inside the digestive tract.' Commensal intestinal microorganisms play a positive role in the interactions with HMs, as demonstrated by we and others (Nakamura et al., 1977; Breton et al., 2013). Provided that microbial species meet criteria for safe dietary use, transitory microorganisms may do at least as well or even better than the resident flora (Plé et al., 2015). Various selected food microbes can thus prevent the absorption of HMs by the body and remove them upon defecation. Promising proof of concept of efficiency was demonstrated in preclinical models of acute and chronic HM toxicity in mice for cadmium (Zhai et al., 2013, 2014), chromium (Younan et al., 2016), and aluminum (Yu et al., 2017). Likewise, a first clinical pilot study showed reduced circulating levels of toxic HMs in pregnant women and children living in a contaminated area: by using a designed fermented milk with a selected probiotic *L. rhamnosus*-supplemented yogurt the bioaccumulation of mercury and arsenic could be reduced (Bisanz et al., 2014). This work clearly illustrates the promising concept of using probiotics in a nutritional strategy against xenobiotics.

Other Attributes and Emerging Properties of LAB

Opportunities to use LAB for health are quite unlimited as the role of intestinal microbiota has now been clearly highlighted in various diseases and pathologies, including those affecting organs at distant sites, cancers, neurologic, and psychological disorders. Some examples are abdominal hyperalgesia and pain that can be controlled by specific strains of lactobacilli targeting nociceptive signals and these strains have been proposed in treatment of irritable bowel syndrome (Ringel-Kulka et al., 2014; Perez-Burgos et al., 2015). Interestingly, in the 2014-clinical study, an *L. acidophilus* strain was clinically effective, but failed to attenuate pain in patients when co-administered with another bacterial strain (*Bifidobacterium lactis*). The results suggest a diversion effect and caution should be taken when using mixtures of strains. In cancer, a higher enterococci count was correlated with a lower risk of colorectal cancer development. Some reports showed an inverse correlation of fecal enterococci with colon adenomas (Kawano et al., 2018), while another study suggested

a deleterious role of *E. faecalis* in colorectal cancer development (Huycke et al., 2002). Selected LAB, such as *Enterococcus hirae*, can be also used to boost cancer chemotherapy (Daillère et al., 2016), while appropriate strains may also play a role in immune cell regulation and exhibit anti-oxidative and antigenotoxic effects.

Other examples of innovative use of LAB as probiotics are in modulating central nervous system functions (Wang H. et al., 2016) and behavior symptoms such as chronic fatigue, depression, and anxiety (Slykerman et al., 2017), although clinical data are yet not fully convincing (Pirbaglou et al., 2016; Ng et al., 2018). The results have led to the definition of 'Psychobiotics' as a novel class of psychotropic treatments employing bacteria with neuroendocrine and behavioral properties (Sarkar et al., 2016). Functional magnetic resonance imaging has been used for the first time to measure brain activation triggered by probiotic LAB (Bagga et al., 2018). A deeper understanding of the relationships between the LAB (within the gut or ingested) and the host, if they do really exist and what are the mechanisms, is required to develop microbial-based therapeutic strategies for brain disorders. Indeed, emerging applications are still on examination, partly due to the lack of consistent studies, appropriate study designs, and the selection of the proper strain(s).

GENERAL CONCLUSION

The LAB are multifaceted microorganisms that have existed on earth for several millions of years, with tens of thousands of years of shared history with animals and humans. They have been used for the production of fermented foods for centuries, and more or less actively developed as probiotics for several decades (**Figure 1**). LAB may strongly be part of the health concept for livestock rearing and in food and feed production. An outstanding effort has been made these last years, using extended omics approaches, to build the knowledge and further tools to elucidate the contribution of LAB in health and diseases. We are now facing the daunting task of integrating of all this information for general application as well as for individual use ("my personalized LAB"). Indeed, separately, LAB can either contribute to induce Th1 or Th2 immune responses; they may also induce specific or non-specific regulatory T cells, which may or may not be required by the host. Similarly, LAB have the potential to favor either weight loss or weight gain. LAB abundance is sometimes diminished or increased depending on diseases. The central role of LAB within the microbiota, providing antimicrobials, also raises the question of the control of ecological niches, which can be advantageous or not (Berstad et al., 2016; Hegarty et al., 2016). Berstad argued that 'we should stop thinking of LAB as always being friendly.' Indeed, few data exist on the long-term impact of LAB, considering their possible capacity to destabilize the microbiota, and the "paradox" to use them empirically in multiple pathologies and combined (metabolic, immune, psychological) disorders. Nevertheless, LAB are our obligate partners and we have to cope with these microorganisms. Dissociating the common

and specific interactions of LAB strains, -species and -genera within the whole of the microbiota in which they partake is still necessary to identify regulatory mechanisms, respectively, involved in distinct organs, systems, and hosts. Definitely, integrative system biology approaches are required to achieve the ultimate goal of applying LAB for personalized medicine. It comprises using omics technologies on the LAB as well as on the host and including foodomics and nutrigenomics (Kusmann and Van Bladeren, 2011; Bordoni and Capozzi, 2014), together with appropriate basic and integrative models and tools (Fritz et al., 2013; Daniel et al., 2015; Papadimitriou et al., 2015) to appraise the overall functionality of LAB.

REFERENCES

- Abrudan, M. I., Brown, S., and Rozen, D. E. (2012). Killing as means of promoting biodiversity. *Biochem. Soc. Trans.* 40, 1512–1516. doi: 10.1042/BST20120196
- Afouda, P., Fournier, P. E., Raoult, D., and Merhej, V. (2017). '*Lactobacillus timonensis*' sp. nov., a new bacterial species isolated from the human gut. *New Microbes New Infect.* 19, 121–122. doi: 10.1016/j.nmni.2017.07.001
- Ahlberg, S. H., Joutsjoki, V., and Korhonen, H. J. (2015). Potential of lactic acid bacteria in aflatoxin risk mitigation. *Int. J. Food Microbiol.* 207, 87–102. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.042
- Alard, J., Lehrter, V., Rhimi, M., Mangin, I., Peucelle, V., Abraham, A. L., et al. (2016). Beneficial metabolic effects of selected probiotics on diet-induced obesity and insulin resistance in mice are associated with improvement of dysbiotic gut microbiota. *Environ. Microbiol.* 18, 1484–1497. doi: 10.1111/1462-2920.13181
- Ali, S. A., Bin-Asif, H., Hasan, K. A., Rehman, M., and Abbasi, A. (2017). Molecular assessment of virulence determinants, hospital associated marker (IS16gene) and prevalence of antibiotic resistance in soil borne *Enterococcus* species. *Microb. Pathog.* 105, 298–306. doi: 10.1016/j.micpath.2017.02.041
- Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D., and Kuipers, O. P. (2016). Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 2939–2951. doi: 10.1007/s00253-016-7343-9
- Andreevskaia, M., Jääskeläinen, E., Johansson, P., Ylinen, A., Paulin, L., Björkroth, J., et al. (2018). Food-spoilage-associated *Leuconostoc*, *Lactococcus*, and *Lactobacillus* species display different survival strategies in response to competition. *Appl. Environ. Microbiol.* 84:AEM.00554-18. doi: 10.1128/AEM.00554-18
- Armougom, F., Henry, M., Vialettes, B., Raccach, D., and Raoult, D. (2009). Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in *Lactobacillus* in obese patients and Methanogens in anorexic patients. *PLoS One* 4:e7125. doi: 10.1371/journal.pone.0007125
- Arnison, P. G., Bibb, M. J., Bierbaum, G., Bowers, A. A., Bugni, T. S., Bulaj, G., et al. (2013). Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. *Nat. Prod. Rep.* 30, 108–160. doi: 10.1039/c2np20085f
- Bagga, D., Reichert, J. L., Koschutnig, K., Aigner, C. S., Holzer, P., Koskinen, K., et al. (2018). Probiotics drive gut microbiome triggering emotional brain signatures. *Gut Microbes* 3, 1–11. doi: 10.1080/19490976.2018
- Berstad, A., Raa, J., Midtvedt, T., and Valeur, J. (2016). Probiotic lactic acid bacteria - the fledgling cuckoos of the gut? *Microb. Ecol. Health Dis.* 27:31557. doi: 10.3402/mehd.v27.31557
- Bhakta, J. N., Ohnishi, K., Munekage, Y., Iwasaki, K., and Wei, M. Q. (2012). Characterization of lactic acid bacteria-based probiotics as potential heavy metal sorbents. *J. Appl. Microbiol.* 112, 1193–1206. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05284.x
- Bindels, L. B., Neyrinck, A. M., Claus, S. P., Le Roy, C. I., Grangette, C., Pot, B., et al. (2016). Synbiotic approach restores intestinal homeostasis and prolongs survival in leukaemic mice with cachexia. *ISME J.* 10, 1456–1470. doi: 10.1038/ismej.2015.209
- Bisanz, J. E., Enos, M. K., Mwanga, J. R., Chagalucha, J., Burton, J. P., Gloor, G. B., et al. (2014). Randomized open-label pilot study of the influence of probiotics and the gut microbiome on toxic metal levels in Tanzanian pregnant women and school children. *MBio.* 5:e01580-14. doi: 10.1128/mBio.01580-14
- Boccia, S., Torre, I., Santarpia, L., Iervolino, C., Del Piano, C., Puggina, A., et al. (2017). Intestinal microbiota in adult patients with short bowel syndrome: preliminary results from a pilot study. *Clin. Nutr.* 36, 1707–1709. doi: 10.1016/j.clnu.2016.09.028
- Booijink, C. C., El-Aidy, S., Rajilic-Stojanovic, M., Heilig, H. G., Troost, F. J., Smidt, H., et al. (2010). High temporal and inter-individual variation detected in the human ileal microbiota. *Environ. Microbiol.* 12, 3213–3227. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02294.x
- Bordoni, A., and Capozzi, F. (2014). Foodomics for healthy nutrition. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 17, 418–424. doi: 10.1097/MCO.000000000000089
- Borges, S., Silva, J., and Teixeira, P. (2014). The role of lactobacilli and probiotics in maintaining vaginal health. *Arch. Gynecol. Obstet.* 289, 479–489. doi: 10.1007/s00404-013-3064-9
- Breton, J., Daniel, C., Dewulf, J., Pothion, S., Froux, N., Sauty, M., et al. (2013). Gut microbiota limits heavy metals burden caused by chronic oral exposure. *Toxicol. Lett.* 222, 132–138. doi: 10.1016/j.toxlet.2013.07.021
- Burgain, J., Scher, J., Francius, G., Borges, F., Corgneau, M., Revol-Junelles, A. M., et al. (2014). Lactic acid bacteria in dairy food: surface characterization and interactions with food matrix components. *Adv. Colloid Interface Sci.* 213, 21–35. doi: 10.1016/j.cis.2014.09.005
- Carding, S., Verbeke, K., Vipond, D. T., Corfe, B. M., and Owen, L. J. (2015). Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microb. Ecol. Health Dis.* 26:26191. doi: 10.3402/mehd.v26.26191
- Chen, Y. S., Yanagida, F., and Shinohara, T. (2005). Isolation and identification of lactic acid bacteria from soil using an enrichment procedure. *Lett. Appl. Microbiol.* 40, 195–200. doi: 10.1111/j.1472-765X.2005.01653.x
- Chiba, M., Itabashi, T., Hirai, K., Sakamoto, M., Ohkuma, M., Ishige, T., et al. (2018). *Lactobacillus metriopecterae* sp. nov., a novel lactic acid bacterium isolated from the gut of grasshopper *Metriopectera engelhardti*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68, 1484–1489. doi: 10.1099/ijsem.0.002694
- Claesson, M. J., van Sinderen, D., and O'Toole, P. W. (2008). *Lactobacillus* phylogenomics—towards a reclassification of the genus. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 2945–2954. doi: 10.1099/ijse.0.65848-0
- Collins, F. W. J., O'Connor, P. M., O'Sullivan, O., Gomez-Sala, B., Rea, M. C., Hill, C., et al. (2017). Bacteriocin Gene-Trait matching across the complete *Lactobacillus* Pan-genome. *Sci. Rep.* 7:3481. doi: 10.1038/s41598-017-03339-y
- Corr, S. C., Li, Y., Riedel, C. U., O'Toole, P. W., Hill, C., and Gahan, C. G. M. (2007). Bacteriocin production as a mechanism for the anti-infective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 7617–7621. doi: 10.1073/pnas.0700440104
- Cotter, P. D., O'Connor, P. M., Draper, L. A., Lawton, E. M., Deegan, L. H., Hill, C., et al. (2005). Posttranslational conversion of l-serines to d-alanines is vital for optimal production and activity of the lantibiotic lactacin 3147. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 18584–18589. doi: 10.1073/pnas.0509371102
- Cotter, P. D., Ross, R. P., and Hill, C. (2013). Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 95–105. doi: 10.1038/nrmicro2937

AUTHOR CONTRIBUTIONS

BF, FG, MT, and FB prepared the manuscript and all co-authors contributed to editing and critical reviewing thereof.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful for the support of the DigestScience Foundation, whose aim is to encourage the research dedicated to digestive diseases and nutrition. We would also like to thank Mr. Basile Laquetaux for his help.

- Cousin, F. J., Lynch, S. M., Harris, H. M., McCann, A., Lynch, D. B., Neville, B. A., et al. (2015). Detection and genomic characterization of motility in *Lactobacillus curvatus*: confirmation of motility in a species outside the *Lactobacillus salivarius* clade. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 1297–1308. doi: 10.1128/AEM.03594-14
- Crovesy, L., Ostrowski, M., Ferreira, D. M. T. P., Rosado, E. L., and Soares-Mota, M. (2017). Effect of *Lactobacillus* on body weight and body fat in overweight subjects: a systematic review of randomized controlled clinical trials. *Int. J. Obes.* 41, 1607–1614. doi: 10.1038/ijo.2017.161
- Daillère, R., Vétizou, M., Waldschmitt, N., Yamazaki, T., Isnard, C., Poirier-Colame, V., et al. (2016). *Enterococcus hirae* and *Barnesiella intestinihominis* facilitate cyclophosphamide-induced therapeutic immunomodulatory effects. *Immunity* 45, 931–943. doi: 10.1016/j.immuni.2016.09.009
- Daisley, B. A., Trinder, M., McDowell, T. W., Collins, S. L., Sumarah, M. W., and Reid, G. (2018). Microbiota-mediated modulation of organophosphate insecticide toxicity by species-dependent interactions with *Lactobacilli* in a *Drosophila melanogaster* insect model. *Appl. Environ. Microbiol.* 84:e02820-17. doi: 10.1128/AEM.02820-17
- Daisley, B. A., Trinder, M., McDowell, T. W., Welle, H., Dube, J. S., Ali, S. N., et al. (2017). Neonicotinoid-induced pathogen susceptibility is mitigated by *Lactobacillus plantarum* immune stimulation in a *Drosophila melanogaster* model. *Sci. Rep.* 7:2703. doi: 10.1038/s41598-017-02806-w
- Daniel, C., Poiret, S., Dennin, V., Boutillier, D., Lacorre, D. A., Foligné, B., et al. (2015). Dual-color bioluminescence imaging for simultaneous monitoring of the intestinal persistence of *Lactobacillus plantarum* and *Lactococcus lactis* in living mice. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 5344–5349. doi: 10.1128/AEM.01042-15
- Dao, M. C., and Clément, K. (2018). Gut microbiota and obesity: concepts relevant to clinical care. *Eur. J. Intern. Med.* 48, 18–24. doi: 10.1016/j.ejim.2017.10.005
- Di Cagno, R., Coda, R., De Angelis, M., and Gobbetti, M. (2013). Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiol.* 33, 1–10. doi: 10.1016/j.fm.2012.09.003
- Dobson, A., Cotter, P. D., Ross, R. P., and Hill, C. (2012). Bacteriocin production: a probiotic trait? *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1–6. doi: 10.1128/AEM.05576-11
- Dominguez-Bello, M. G., Costello, E. K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., et al. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 11971–11975. doi: 10.1073/pnas.1002601107
- Doyle, R., Gondwe, A., Fan, Y. M., Maleta, K., Ashorn, P., Klein, N., et al. (2018). *Lactobacillus*-deficient vaginal microbiota dominate post-partum women in rural Malawi. *Appl. Environ. Microbiol.* doi: 10.1128/AEM.02150-17 [Epub ahead of print].
- Drissi, F., Merhej, V., Angelakis, E., El Kaoutari, A., Carrière, F., Henrissat, B., et al. (2014). Comparative genomics analysis of *Lactobacillus* species associated with weight gain or weight protection. *Nutr. Diabetes* 4:e109. doi: 10.1038/nutd.2014.6
- Duar, R. M., Lin, X. B., Zheng, J., Martino, M. E., Grenier, T., Pérez-Muñoz, M. E., et al. (2017). Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*. *FEMS Microbiol. Rev.* 41, S27–S48. doi: 10.1093/femsre/fux030
- Dubin, K., and Pamer, E. G. (2014). Enterococci and their interactions with the intestinal microbiome. *Microbiol. Spectr.* 5, 1–24. doi: 10.1128/microbiolspec.BAD-0014-2016
- Egerton, S., Culloty, S., Whooley, J., Stanton, C., and Ross, R. P. (2018). The gut microbiota of marine fish. *Front. Microbiol.* 9:873. doi: 10.3389/fmicb.2018.00873
- Ejtahed, H. S., Mohtadi-Nia, J., Homayouni-Rad, A., Niafar, M., Asghari-Jafarabadi, M., and Mofid, V. (2012). Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetic patients. *Nutrition* 28, 539–543. doi: 10.1016/j.nut.2011.08.013
- Endo, A. (2012). Fructophilic lactic acid bacteria inhabit fructose-rich niches in nature. *Microb. Ecol. Health Dis.* 23, doi: 10.3402/mehd.v23i0.18563
- Phoula, I., Najjari, A., Turkji, Y., Jaballah, S., Boudabous, A., and Ouzari, H. (2013). Diversity and antimicrobial properties of lactic acid bacteria isolated from rhizosphere of olive trees and desert truffles of Tunisia. *Biomed. Res. Int.* 2013:405708. doi: 10.1155/2013/405708
- Filannino, P., Di Cagno, R., and Gobbetti, M. (2018). Metabolic and functional paths of lactic acid bacteria in plant foods: get out of the labyrinth. *Curr. Opin. Biotechnol.* 49, 64–72. doi: 10.1016/j.copbio.2017.07.016
- Foligné, B., Daniel, C., and Pot, B. (2013). Probiotics from research to market: the possibilities, risks and challenges. *Curr. Opin. Microbiol.* 16, 284–292. doi: 10.1016/j.mib.2013.06.008
- Foligné, B., Dewulf, J., Breton, J., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., and Pot, B. (2010). Probiotic properties of non-conventional lactic acid bacteria: immunomodulation by *Oenococcus oeni*. *Int. J. Food Microbiol.* 140, 136–145. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.007
- Forbes, J. D., Van Domselaar, G., and Bernstein, C. N. (2016). The gut microbiota in immune-mediated inflammatory diseases. *Front. Microbiol.* 7:1081. doi: 10.3389/fmicb.2016.01081
- Franceschi, C., Garagnani, P., Vitale, G., Capri, M., and Salvioli, S. (2017). Inflammaging and 'Garb-aging'. *Trends Endocrinol. Metab.* 28, 199–212. doi: 10.1016/j.tem.2016.09.005
- Franz, C. M., Stiles, M. E., Schleifer, K. H., and Holzapfel, W. H. (2003). Enterococci in foods—a conundrum for food safety. *Int. J. Food. Microbiol.* 88, 105–122. doi: 10.1016/S0168-1605(03)00174-0
- Friswell, M. K., Gika, H., Stratford, I. J., Theodoridis, G., Telfer, B., Wilson, I. D., et al. (2010). Site and strain-specific variation in gut microbiota profiles and metabolism in experimental mice. *PLoS One* 5:e8584. doi: 10.1371/journal.pone.0008584
- Fritz, J. V., Desai, M. S., Shah, P., Schneider, J. G., and Wilmes, P. (2013). From meta-omics to causality: experimental models for human microbiome research. *Microbiome* 1:14. doi: 10.1186/2049-2618-1-14
- Fuchs, S., Sontag, G., Stidl, R., Ehrlich, V., Kundi, M., and Knasmüller, S. (2008). Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. *Food Chem. Toxicol.* 46, 1398–1407. doi: 10.1016/j.fct.2007.10.008
- Gänzle, M. G. (2015). Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Curr. Opin. Food Sci.* 2, 106–117. doi: 10.1016/j.cofs.2015.03.001
- Gao, C., Major, A., Rendon, D., Lugo, M., Jackson, V., Shi, Z., et al. (2015). Histamine H2 receptor-mediated suppression of intestinal inflammation by probiotic *Lactobacillus reuteri*. *mBio* 6:e01358-15. doi: 10.1128/mBio.01358-15
- Gérard, P. (2016). Gut microbiota and obesity. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 147–162. doi: 10.1007/s00018-015-2061-5
- Gillard, L., Mayeur, C., Robert, V., Pinget, I., Le Beyec, J., Bado, A., et al. (2017). Microbiota is involved in post-resection adaptation in humans with short bowel syndrome. *Front. Physiol.* 8:224. doi: 10.3389/fphys.2017.00224
- Goldstein, E. J., Tyrrell, K. L., and Citron, D. M. (2015). *Lactobacillus* species: taxonomic complexity and controversial susceptibilities. *Clin. Infect. Dis.* 60, S98–S107. doi: 10.1093/cid/civ072
- Gollwitzer, E. S., Saglani, S., Trompette, A., Yadava, K., Sherburn, R., McCoy, K. D., et al. (2014). Lung microbiota promotes tolerance to allergens in neonates via PD-L1. *Nat. Med.* 20, 642–647. doi: 10.1038/nm.3568
- Górska, S., Sandström, C., Wojas-Turek, J., Rossowska, J., Pajtasz-Piasecka, E., Brzozowska, E., et al. (2016). Structural and immunomodulatory differences among *Lactobacilli* exopolysaccharides isolated from intestines of mice with experimentally induced inflammatory bowel disease. *Sci. Rep.* 6:37613. doi: 10.1038/srep37613
- Górska, S., Schwarzer, M., Jachymek, W., Srutkova, D., Brzozowska, E., Kozakova, H., et al. (2014). Distinct immunomodulation of bone marrow-derived dendritic cell responses to *Lactobacillus plantarum* WCFS1 by two different polysaccharides isolated from *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0900. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 6506–6516. doi: 10.1128/AEM.02104-14
- Gosmann, C., Anahtar, M. N., Handley, S. A., Farcasanu, M., Abu-Ali, G., Bowman, B. A., et al. (2017). *Lactobacillus*-deficient cervicovaginal bacterial communities are associated with increased HIV acquisition in young South African women. *Immunity* 46, 29–37. doi: 10.1016/j.immuni.2016.12.013
- Grangette, C., Nutton, S., Palumbo, E., Morath, S., Hermann, C., Dewulf, J., et al. (2005). Enhanced antiinflammatory capacity of a *Lactobacillus plantarum* mutant synthesizing modified teichoic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 10321–10326. doi: 10.1073/pnas.0504084102
- Halttunen, T., Collado, M. C., El-Nezami, H., Meriluoto, J., and Salminen, S. (2008). Combining strains of lactic acid bacteria may reduce their toxin and heavy metal removal efficiency from aqueous solution. *Lett. Appl. Microbiol.* 46, 160–165. doi: 10.1111/j.1472-765X.2007.02276.x
- Halttunen, T., Salminen, S., and Tahvonen, R. (2007). Rapid removal of lead and cadmium from water by specific lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 114, 30–35. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.040

- Harata, G., He, F., Hiruta, N., Kawase, M., Kubota, A., Hiramatsu, M., et al. (2010). Intranasal administration of *Lactobacillus rhamnosus* GG protects mice from H1N1 influenza virus infection by regulating respiratory immune responses. *Lett. Appl. Microbiol.* 50, 597–602. doi: 10.1111/j.1472-765X.2010.02844.x
- Heeney, D. D., Gareau, M. G., and Marco, M. L. (2018). Intestinal *Lactobacillus* in health and disease, a driver or just along for the ride? *Curr. Opin. Biotechnol.* 49, 140–147. doi: 10.1016/j.copbio.2017.08.004
- Hegarty, J. W., Guinane, C. M., Ross, R. P., Hill, C., and Cotter, P. D. (2016). Bacteriocin production: a relatively unharnessed probiotic trait? *F1000Res* 5:2587.
- Hernandez-Mendoza, A., González-Córdova, A. F., Vallejo-Cordoba, B., and Garcia, H. S. (2011). Effect of oral supplementation of *Lactobacillus reuteri* in reduction of intestinal absorption of aflatoxin B(1) in rats. *J. Basic Microbiol.* 51, 263–268. doi: 10.1002/jobm.201000119
- Hevia, A., Delgado, S., Sánchez, B., and Margolles, A. (2015). Molecular players involved in the interaction between beneficial bacteria and the immune system. *Front. Microbiol.* 6:1285. doi: 10.3389/fmicb.2015.01285
- Hilty, M., Burke, C., Pedro, H., Cardenas, P., Bush, A., Bossley, C., et al. (2010). Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PLoS One* 5:e8578. doi: 10.1371/journal.pone.0008578
- Hoermannsperger, G., Clavel, T., Hoffmann, M., Reiff, C., Kelly, D., Loh, G., et al. (2009). Post-translational inhibition of IP-10 secretion in IEC by probiotic bacteria: impact on chronic inflammation. *PLoS One* 4:e4365. doi: 10.1371/journal.pone.0004365
- Holzapfel, W., Arini, A., Aeschbacher, M., Coppolecchia, R., and Pot, B. (2018). Enterococcus faecium SF68 as a model for efficacy and safety evaluation of pharmaceutical probiotics. *Benef. Microbes* 9, 375–388. doi: 10.3920/BM2017.0148
- Hsieh, F. C., Lee, C. L., Chai, C. Y., Chen, W. T., Lu, Y. C., and Wu, C. S. (2013). Oral administration of *Lactobacillus reuteri* GMNL-263 improves insulin resistance and ameliorates hepatic steatosis in high fructose-fed rats. *Nutr. Metab.* 10:35. doi: 10.1186/1743-7075-10-35
- Huycke, M. M., Abrams, V., and Moore, D. R. (2002). Enterococcus faecalis produces extracellular superoxide and hydrogen peroxide that damages colonic epithelial cell DNA. *Carcinogenesis* 23, 529–536. doi: 10.1093/carcin/23.3.529
- Ibrahim, F., Halttunen, T., Tahvonen, R., and Salminen, S. (2006). Probiotic bacteria as potential detoxification tools: assessing their heavy metal binding isotherms. *Can. J. Microbiol.* 52, 877–885. doi: 10.1139/w06-043
- Iliev, I. D., Tohno, M., Kurosaki, D., Shimamoto, T., He, F., Hosoda, M., et al. (2008). Immunostimulatory oligodeoxynucleotide containing TTTCGTTT motif from *Lactobacillus rhamnosus* GG DNA potentially suppresses OVA-specific IgE production in mice. *Scand. J. Immunol.* 67, 370–376. doi: 10.1111/j.1365-3083.2008.02080.x
- Iskandar, C. F., Borges, F., Taminiau, B., Daube, G., Zagorec, M., Remenant, B., et al. (2017). Comparative genomic analysis reveals ecological differentiation in the genus Carnobacterium. *Front. Microbiol.* 8:357. doi: 10.3389/fmicb.2017.00357
- Islam, S. M., Math, R. K., Cho, K. M., Lim, W. J., Hong, S. Y., Kim, J. M., et al. (2010). Organophosphorus hydrolase (OpdB) of *Lactobacillus brevis* WCP902 from kimchi is able to degrade organophosphorus pesticides. *J. Agric. Food Chem.* 58, 5380–5386. doi: 10.1021/jf903878e
- Jebali, R., Abbès, S., Salah-Abbès, J. B., Younes, R. B., Haous, Z., and Oueslati, R. (2015). Ability of *Lactobacillus plantarum* MON03 to mitigate aflatoxins (B1 and M1) immunotoxicities in mice. *J. Immunotoxicol.* 12, 290–299. doi: 10.3109/1547691X.2014.973622
- Ji, Y., Park, S., Park, H., Hwang, E., Shin, H., Pot, B., et al. (2018). Modulation of active gut microbiota by *Lactobacillus rhamnosus* GG in a diet induced obesity murine model. *Front. Microbiol.* 9:710. doi: 10.3389/fmicb.2018.00710
- Joly, F., Mayeur, C., Bruneau, A., Noordine, M. L., Meylheuc, T., Langella, P., et al. (2010). Drastic changes in fecal and mucosa-associated microbiota in adult patients with short bowel syndrome. *Biochimie* 92, 753–761. doi: 10.1016/j.biochi.2010.02.015
- Kajikawa, A., Midorikawa, E., Masuda, K., Kondo, K., Irisawa, T., Igimi, S., et al. (2016). Characterization of flagellins isolated from a highly motile strain of *Lactobacillus agilis*. *BMC Microbiol.* 16:49. doi: 10.1186/s12866-016-0667-x
- Kamboj, K., Vasquez, A., and Balada-Llasat, J. M. (2015). Identification and significance of Weissella species infections. *Front. Microbiol.* 6:1204. doi: 10.3389/fmicb.2015.01204
- Karlsson, F. H., Tremaroli, V., Nookaew, I., Bergström, G., Behre, C. J., Fagerberg, B., et al. (2013). Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature* 498, 99–103. doi: 10.1038/nature12198
- Kawano, A., Ishikawa, H., Mutoh, M., Kubota, H., Matsuda, K., Tsuji, H., et al. (2018). Higher enterococcus counts indicate a lower risk of colorectal adenomas: a prospective cohort study. *Oncotarget* 9, 21459–21467. doi: 10.18632/oncotarget.25130
- Kerry, R. G., Patra, S., Gouda, Y., Park, Shin, H. S., and Das, G. (2018). Benefaction of probiotics for human health: a review. *J. Food Drug Anal.* 26, 927–939. doi: 10.1016/j.jfda.2018.01.002
- Kinoshita, H., Sohma, Y., Ohtake, F., Ishida, M., Kawai, Y., Kitazawa, H., et al. (2013). Biosorption of heavy metals by lactic acid bacteria and identification of mercury binding protein. *Res. Microbiol.* 164, 701–709. doi: 10.1016/j.resmic.2013.04.004
- Konstantinov, S. R., Smidt, H., de Vos, W. M., Bruijns, S. C., Singh, S. K., Valence, F., et al. (2008). S layer protein A of *Lactobacillus acidophilus* NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 19474–19479. doi: 10.1073/pnas.0810305105
- Kulecka, M., Paziewska, A., Zeber-Lubecka, N., Ambroziewicz, F., Kopczynski, M., Kuklinska, U., et al. (2016). Prolonged transfer of feces from the lean mice modulates gut microbiota in obese mice. *Nutr. Metab.* 13:57. doi: 10.1186/s12986-016-0116-8
- Kumar, N., Kumari, V., Ram, C., Thakur, K., and Tomar, S. K. (2018). Bio-prospectus of cadmium bioadsorption by lactic acid bacteria to mitigate health and environmental impacts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 1599–1615. doi: 10.1007/s00253-018-8743-9
- Kusmann, M., and Van Bladeren, P. J. (2011). The Extended Nutrigenomics - Understanding the interplay between the genomes of food, gut microbes, and human host. *Front. Genet.* 2:21. doi: 10.3389/fgene.2011.00021
- Lagier, J. C., Hugon, P., Khelaifa, S., Fournier, P. E., La Scola, B., and Raoult, D. (2015). The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota. *Clin. Microbiol. Rev.* 28, 237–264. doi: 10.1128/CMR.00014-14
- Lamas, B., Richard, M. L., Leducq, V., Pham, H. P., Michel, M. L., Da Costa, G., et al. (2016). CARD9 impacts colitis by altering gut microbiota metabolism of tryptophan into aryl hydrocarbon receptor ligands. *Nat. Med.* 22, 598–605. doi: 10.1038/nm.4102
- Lamont, J. R., Wilkins, O., Bywater-Ekegård, M., and Smith, D. L. (2017). From yogurt to yield: potential applications of lactic acid bacteria in plant production. *Soil Biol. Biochem.* 111, 1–9. doi: 10.1016/j.soilbio.2017.03.015
- Larsen, N., Vogensen, F. K., van den Berg, F. W., Nielsen, D. S., Andreasen, A. S., Pedersen, B. K., et al. (2010). Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS One* 5:e9085. doi: 10.1371/journal.pone.0009085
- Layton, B. A., Walters, S. P., Lam, L. H., and Boehm, A. B. (2010). Enterococcus species distribution among human and animal hosts using multiplex PCR. *J. Appl. Microbiol.* 109, 539–547. doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04675.x
- Lebeer, S., Bron, P. A., Marco, M. L., Van Pijkeren, J. P., O'Connell Motherway, M., Hill, C., et al. (2018). Identification of probiotic effector molecules: present state and future perspectives. *Curr. Opin. Biotechnol.* 49, 217–223. doi: 10.1016/j.copbio.2017.10.007
- Lebeer, S., Claes, I., Tytgat, H. L., Verhoeven, T. L., Marien, E., von Ossowski, I., et al. (2012). Functional analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG pili in relation to adhesion and immunomodulatory interactions with intestinal epithelial cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 185–193. doi: 10.1128/AEM.06192-11
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., and De Keersmaecker, S. C. (2010). Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 171–184. doi: 10.1038/nrmicro2297
- Lebreton, F., van Schaik, W., McGuire, A. M., Godfrey, P., Griggs, A., Mazumdar, V., et al. (2013). Emergence of epidemic multidrug-resistant Enterococcus faecium from animal and commensal strains. *mBio* 4:e00534-13. doi: 10.1128/mBio.00534-13

- Lee, B., Yin, X., Griffey, S. M., and Marco, M. L. (2015). Attenuation of Colitis by *Lactobacillus casei* BL23 is dependent on the dairy delivery matrix. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 6425–6435. doi: 10.1128/AEM.01360-15
- Leroy, F., and De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Tech.* 15, 67–78. doi: 10.1016/j.tifs.2003.09.004
- Leulier, F., and Royet, J. (2009). Maintaining immune homeostasis in fly gut. *Nat. Immunol.* 10, 936–938. doi: 10.1038/ni0909-936
- Ley, R. E., Bäckhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A., Knight, R. D., and Gordon, J. I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 11070–11075. doi: 10.1073/pnas.0504978102
- Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S., and Gordon, J. I. (2006). Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444, 1022–1023. doi: 10.1038/4441022a
- Lin, P. W., Myers, L. E., Ray, L., Song, S. C., Nasr, T. R., Berardinelli, A. J., et al. (2009). *Lactobacillus rhamnosus* blocks inflammatory signaling in vivo via reactive oxygen species generation. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 1205–1211. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.07.033
- Linares, D. M., Gómez, C., Renes, E., Fresno, J. M., Tornadito, M. E., Ross, R. P., et al. (2017). Lactic acid bacteria and bifidobacteria with potential to design natural biofunctional health-promoting dairy foods. *Front. Microbiol.* 8:846. doi: 10.3389/fmicb.2017.00846
- Lortal, S., Licitra, G., and Valence, F. (2014). Wooden tools: reservoirs of microbial biodiversity in traditional cheesemaking. *Microbiol. Spectr.* 2:CM-0008–2012. doi: 10.1128/microbiolspec.CM-0008-2012
- Macho Fernandez, E., Valenti, V., Rockel, C., Hermann, C., Pot, B., Boneca, I. G., et al. (2011). Anti-inflammatory capacity of selected lactobacilli in experimental colitis is driven by NOD2-mediated recognition of a specific peptidoglycan-derived muropeptide. *Gut* 60, 1050–1059. doi: 10.1136/gut.2010.232918
- Marco, M. L., Heeney, D., Binda, S., Cifelli, C. J., Cotter, P. D., Foligné, B., et al. (2017). Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Curr. Opin. Biotechnol.* 44, 94–102. doi: 10.1016/j.copbio.2016.11.010
- Martinez, M. P., Gonzalez Pereyra, M. L., Pena, G. A., Poloni, V., Fernandez Juri, G., and Cavaglieri, L. R. (2017). *Pediococcus acidolactici* and *Pediococcus pentosaceus* isolated from a rainbow trout ecosystem have probiotic and ABFI adsorbing/degrading abilities in vitro. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 34, 2118–2130. doi: 10.1080/19440049.2017.1371854
- Maruvada, P., Leone, V., Kaplan, L. M., and Chang, E. B. (2017). The human microbiome and obesity: moving beyond associations. *Cell Host Microbe* 22, 589–599. doi: 10.1016/j.chom.2017.10.005
- Mathur, H., Field, D., Rea, M. C., Cotter, P. D., Hill, C., and Ross, R. P. (2017). Bacteriocin-antimicrobial synergy: a medical and food perspective. *Front. Microbiol.* 8:1205. doi: 10.3389/fmicb.2017.01205
- Matos, R. C., and Leulier, F. (2014). Lactobacilli-Host mutualism: "learning on the fly". *Microb. Cell. Fact.* 13:S6. doi: 10.1186/1475-2859-13-S1-S6
- Maurice, C. F., Knowles, S. C., Ladau, J., Pollard, K. S., Fenton, A., Pedersen, A. B., et al. (2015). Marked seasonal variation in the wild mouse gut microbiota. *ISME J.* 9, 2423–2434. doi: 10.1038/ismej.2015.53
- Mayeur, C., Gillard, L., Le Beyec, J., Bado, A., Joly, F., and Thomas, M. (2016). Extensive intestinal resection triggers behavioral adaptation, intestinal remodeling and microbiota transition in short bowel syndrome. *Microorganisms* 4, E16. doi: 10.3390/microorganisms4010016
- McAuliffe, O. (2018). Symposium review: *Lactococcus lactis* from nondairy sources: their genetic and metabolic diversity and potential applications in cheese. *J. Dairy Sci.* 101, 3597–3610. doi: 10.3168/jds.2017-13331
- Miller, E. A., Beasley, D. E., Dunn, R. R., and Archie, E. A. (2016). Lactobacilli dominance and vaginal pH: Why is the human vaginal microbiome unique? *Front. Microbiol.* 7:1936. doi: 10.3389/fmicb.2016.01936
- Minervini, F., Celano, G., Lattanzi, A., Tedone, L., De Mastro, G., Gobbetti, M., et al. (2015). Lactic acid bacteria in durum wheat flour are endophytic components of the plant during its entire life cycle. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 6736–6748. doi: 10.1128/AEM.01852-15
- Miranda, P. M., De Palma, G., Serkis, V., Lu, J., Louis-Auguste, M. P., McCarville, J. L., et al. (2018). High salt diet exacerbates colitis in mice by decreasing *Lactobacillus* levels and butyrate production. *Microbiome* 6:57. doi: 10.1186/s40168-018-0433-4
- Monachese, M., Burton, J. P., and Reid, G. (2012). Bioremediation and tolerance of humans to heavy metals through microbial processes: a potential role for probiotics? *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 6397–6404. doi: 10.1128/AEM.01665-12
- Moroti, C., Souza Magri, L. F., de Rezende Costa, M., Cavallini, D. C., and Sivieri, K. (2012). Effect of the consumption of a new symbiotic shake on glycemia and cholesterol levels in elderly people with type 2 diabetes mellitus. *Lipids Health Dis.* 11:29. doi: 10.1186/1476-511X-11-29
- Murphy, E. F., Cotter, P. D., Hogan, A., O'Sullivan, O., Joyce, A., Fouhy, F., et al. (2013). Divergent metabolic outcomes arising from targeted manipulation of the gut microbiota in diet-induced obesity. *Gut* 62, 220–226. doi: 10.1136/gutjnl-2011-300705
- Nakamura, I., Hosokawa, K., Tamura, H., and Miura, T. (1977). Reduced mercury excretion with feces in germfree mice after oral administration of methyl mercury chloride. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 17, 528–533. doi: 10.1007/BF01685974
- Ng, Q. X., Peters, C., Ho, C. Y. X., Lim, D. Y., and Yeo, W. S. (2018). A meta-analysis of the use of probiotics to alleviate depressive symptoms. *J. Affect. Disord.* 228, 13–19. doi: 10.1016/j.jad.2017.11.063
- Nguyen, T. L., Vieira-Silva, S., Liston, A., and Raes, J. (2015). How informative is the mouse for human gut microbiota research? *Dis. Model Mech.* 8, 1–16. doi: 10.1242/dmm.017400
- Nikbakht Nasrabadi, E., Jamaluddin, R., Abdul Mutalib, M. S., Khaza'i, H., Khalesi, S., and Mohd Redzwan, S. (2013). Reduction of aflatoxin level in aflatoxin-induced rats by the activity of probiotic *Lactobacillus casei* strain Shirota. *J. Appl. Microbiol.* 114, 1507–1515. doi: 10.1111/jam.12148
- Oleksy, M., and Klewicka, E. (2018). Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* sp.: Biosynthesis and applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 58, 450–462. doi: 10.1080/10408398.2016.1187112
- Papadimitriou, K., Zoumpopoulou, G., Foligné, B., Alexandraki, V., Kazou, M., Pot, B., et al. (2015). Discovering probiotic microorganisms: in vitro, in vivo, genetic and omics approaches. *Front. Microbiol.* 6:58. doi: 10.3389/fmicb.2015.00058
- Park, S., Ji, Y., Jung, H. Y., Park, H., Kang, J., Choi, S. H., et al. (2017). *Lactobacillus plantarum* HAC01 regulates gut microbiota and adipose tissue accumulation in a diet-induced obesity murine model. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 1605–1614. doi: 10.1007/s00253-016-7953-2
- Pei, F., Li, B. Y., Zhang, Z., Yu, F., Li, X. L., Lu, W. D., et al. (2014). Beneficial effects of phlorizin on diabetic nephropathy in diabetic db/db mice. *J. Diabetes Complications* 28, 596–603. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2014.04.010
- Perez, R. H., Zendo, T., and Sonomoto, K. (2014). Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microb. Cell Fact.* 13(Suppl. 1), S3. doi: 10.1186/1475-2859-13-S1-S3
- Perez-Burgos, A., Wang, L., McVey Neufeld, K. A., Mao, Y. K., Ahmadzai, M., Janssen, L. J., et al. (2015). The TRPV1 channel in rodents is a major target for antinociceptive effect of the probiotic *Lactobacillus reuteri* DSM 17938. *J. Physiol.* 593, 3943–3957. doi: 10.1113/jp270229
- Pessione, E. (2012). Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2:86. doi: 10.3389/fcimb.2012.00086
- Petrova, M. I., Reid, G., Vaneechoutte, M., and Lebeer, S. (2017). *Lactobacillus iners*: Friend or Foe? *Trends Microbiol.* 25, 182–191. doi: 10.1016/j.tim.2016.11.007
- Pirbaglou, M., Katz, J., de Souza, R. J., Stearns, J. C., Motamed, M., and Ritvo, P. (2016). Probiotic supplementation can positively affect anxiety and depressive symptoms: a systematic review of randomized controlled trials. *Nutr. Res.* 36, 889–898. doi: 10.1016/j.nutres.2016.06.009
- Plé, C., Breton, J., Daniel, C., and Foligné, B. (2015). Maintaining gut ecosystems for health: Are transitory food bugs stowaways or part of the crew? *Int. J. Food Microbiol.* 213, 139–143. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.015
- Rahman, A., Gleinser, M., Lanhers, M. C., Riedel, C. U., Foligné, B., Hanse, M., et al. (2014). Survival of the psychrotrophic bacterium *Carnobacterium maltaromaticum* LMA 28 in the mice gastrointestinal tract, adhesion and immune consideration to human cells. *Int. Dairy J.* 34, 93–99. doi: 10.1016/j.idairyj.2013.07.003
- Remot, A., Descamps, D., Noordine, M. L., Boukadiri, A., Mathieu, E., Robert, V., et al. (2017). Bacteria isolated from lung modulate asthma susceptibility in mice. *ISME J.* 11, 1061–1074. doi: 10.1038/ismej.2016.181

- Ricci, A., Allende, A., Bolton, D., Chemaly, M., Davies, R., Girones, R., et al. (2017). Statement on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 6: suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2017. *EFSA J.* 15:33. doi: 10.2903/j.efsa.2017.4884
- Riley, M. A., and Wertz, J. E. (2002). Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 117–137. doi: 10.1146/annurev.micro.56.012302.161024
- Ringel-Kulka, T., Goldsmith, J. R., Carroll, I. M., Barros, S. P., Palsson, O., Jobin, C., et al. (2014). *Lactobacillus acidophilus* NCFM affects colonic mucosal opioid receptor expression in patients with functional abdominal pain - a randomised clinical study. *Aliment Pharmacol. Ther.* 40, 200–207. doi: 10.1111/apt.12800
- Rivas-Jimenez, L., Ramírez-Ortiz, K., González-Córdova, A. F., Vallejo-Cordoba, B., Garcia, H. S., and Hernandez-Mendoza, A. (2016). Evaluation of acrylamide-removing properties of two *Lactobacillus* strains under simulated gastrointestinal conditions using a dynamic system. *Microbiol. Res.* 190, 19–26. doi: 10.1016/j.micres.2016.04.016
- Rook, G. A. (2013). Regulation of the immune system by biodiversity from the natural environment: an ecosystem service essential to health. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 18360–18367. doi: 10.1073/pnas.1313731110
- Rosing, J. A., Walker, K. C., Jensen, B. A. H., and Heitmann, B. L. (2017). Oral *Lactobacillus* counts predict weight gain susceptibility: a 6-year follow-up study. *Obes. Facts* 10, 473–482. doi: 10.1159/000478095
- Rossi, M., Martínez-Martínez, D., Amaretti, A., Ulrici, A., Raimondi, S., and Moya, A. (2016). Mining metagenomic whole genome sequences revealed subdominant but constant *Lactobacillus* population in the human gut microbiota. *Environ. Microbiol. Rep.* 8, 399–406. doi: 10.1111/1758-2229.12405
- Rul, F., Ben-Yahia, L., Chegdani, F., Wrzosek, L., Thomas, S., Noordine, M. L., et al. (2011). Impact of the metabolic activity of *Streptococcus thermophilus* on the colon epithelium of gnotobiotic rats. *J. Biol. Chem.* 286, 10288–10296. doi: 10.1074/jbc.M110.168666
- Salveti, E., Torriani, S., and Felis, G. E. (2012). The genus *Lactobacillus*: a taxonomic update. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 4, 217–226. doi: 10.1007/s12602-012-9117-8
- Sanders, M. E. (2007). Probiotics: strains matter. *Funct. Food Nutraceuticals* 34–41. Available at: <https://www.newhope.com/ingredients-general/probiotics-strains-matter>
- Sanders, M. E., Benson, A., Lebeer, S., Merenstein, D. J., and Klaenhammer, T. R. (2018). Shared mechanisms among probiotic taxa: implications for general probiotic claims. *Curr. Opin. Biotechnol.* 49, 207–216. doi: 10.1016/j.copbio.2017.09.007
- Sarkar, A., Lehto, S. M., Harty, S., Dinan, T. G., Cryan, J. F., and Burnett, P. W. J. (2016). Psychobiotics and the manipulation of bacteria-gut-brain signals. *Trends Neurosci.* 39, 763–781. doi: 10.1016/j.tins.2016.09.002
- Satokari, R. M., Vaughan, E. E., Smidt, H., Saarela, M., Mättö, J., and de Vos, W. M. (2003). Molecular approaches for the detection and identification of bifidobacteria and lactobacilli in the human gastrointestinal tract. *Syst. Appl. Microbiol.* 26, 572–584. doi: 10.1078/072320203770865882
- Schär-Zammaretti, P., and Ubbink, J. (2003). The cell wall of lactic acid bacteria: surface constituents and macromolecular conformations. *Biophys. J.* 85, 4076–4092. doi: 10.1016/S0006-3495(03)74820-6
- Schwarzer, M., Makki, K., Storelli, G., Machuca-Gayet, I., Srutkova, D., Hermanova, P., et al. (2016). *Lactobacillus plantarum* strain maintains growth of infant mice during chronic undernutrition. *Science* 351, 854–857. doi: 10.1126/science.aad8588
- Serrano-Nino, J. C., Cavazos-Garduno, A., Gonzalez-Cordova, A. F., Vallejo-Cordoba, B., Hernández-Mendoza, A., and Garcia, H. S. (2014). In vitro study of the potential protective role of *Lactobacillus* strains by acrylamide binding. *J. Food Safety* 34, 62–68. doi: 10.1111/jfs.12096
- Singh, N., Vats, A., Sharma, A., Arora, A., and Kumar, A. (2017). The development of lower respiratory tract microbiome in mice. *Microbiome* 5:61. doi: 10.1186/s40168-017-0277-3
- Slykerman, R. F., Hood, F., Wickens, K., Thompson, J. M. D., Barthow, C., Murphy, R., et al. (2017). Effect of *Lactobacillus rhamnosus* HN001 in pregnancy on postpartum symptoms of depression and anxiety: a randomised double-blind placebo-controlled trial. *EBioMedicine* 24, 159–165. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.09.013
- Spurbeck, R. R., and Arvidson, C. G. (2011). Lactobacilli at the front line of defense against vaginally acquired infections. *Future Microbiol.* 6, 567–582. doi: 10.2217/fmb.11.36
- Sun, Z., Harris, H. M., McCann, A., Guo, C., Argimón, S., Zhang, W., et al. (2015). Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera. *Nat. Commun.* 6:8322. doi: 10.1038/ncomms9322
- Tabuchi, M., Ozaki, M., Tamura, A., Yamada, N., Ishida, T., Hosoda, M., et al. (2003). Antidiabetic effect of *Lactobacillus* GG in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 1421–1424. doi: 10.1271/bbb.67.1421
- Takamura, T., Harama, D., Fukumoto, S., Nakamura, Y., Shimokawa, N., Ishimaru, K., et al. (2011). *Lactobacillus bulgaricus* OLL1181 activates the aryl hydrocarbon receptor pathway and inhibits colitis. *Immunol. Cell. Biol.* 89, 817–822. doi: 10.1038/icb.2010.165
- Tamang, J. P., Shin, D. H., Jung, S. J., and Chae, S. W. (2016a). Functional properties of microorganisms in fermented foods. *Front. Microbiol.* 7:578. doi: 10.3389/fmicb.2016.00578
- Tamang, J. P., Watanabe, K., and Holzapfel, W. H. (2016b). Review: diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. *Front. Microbiol.* 7:377. doi: 10.3389/fmicb.2016.00377
- Tannock, G. W. (2004). A special fondness for lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3189–3194. doi: 10.1128/AEM.70.6.3189-3194.2004
- Trinder, M., Bisanz, J. E., Burton, J. P., and Reid, G. (2015). Probiotic lactobacilli: a potential prophylactic treatment for reducing pesticide absorption in humans and wildlife. *Benef. Microbes* 6, 841–847. doi: 10.3920/BM2015.0022
- Trinder, M., McDowell, T. W., Daisley, B. A., Ali, S. N., Leong, H. S., Sumarah, M. W., et al. (2016). Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* reduces organophosphate pesticide absorption and toxicity to *Drosophila melanogaster*. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 6204–6213. doi: 10.1128/AEM.01510-16
- Trompette, A., Gollwitzer, E. S., Yadava, K., Sichelstiel, A. K., Sprenger, N., Ngom-Bru, C., et al. (2014). Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nat. Med.* 20, 159–166. doi: 10.1038/nm.3444
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., and Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444, 1027–1031. doi: 10.1038/nature05414
- Turróni, F., Ventura, M., Buttó, L. F., Duranti, S., O'Toole, P. W., Motherway, M. O., et al. (2014). Molecular dialogue between the human gut microbiota and the host: a *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* perspective. *Cell. Mol. Life Sci.* 71, 183–203. doi: 10.1007/s00018-013-1318-0
- Turturice, B. A., McGee, H. S., Oliver, B., Baraket, M., Nguyen, B. T., Ascoli, C., et al. (2017). Atopic asthmatic immune phenotypes associated with airway microbiota and airway obstruction. *PLoS One* 12:e0184566. doi: 10.1371/journal.pone.0184566
- Umu, Ö. C. O., Bäuerl, C., Oostindjer, M., Pope, P. B., Hernández, P. E., Pérez-Martínez, G., et al. (2016). The potential of class II bacteriocins to modify gut microbiota to improve host health. *PLoS One* 11:e0164036. doi: 10.1371/journal.pone.0164036
- van Tongeren, S. P., Slaets, J. P., Harmsen, H. J., and Welling, G. W. (2005). Fecal microbiota composition and frailty. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6438–6442. doi: 10.1128/AEM.71.10.6438-6442.2005
- Vanechoutte, M. (2017a). *Lactobacillus iners*, the unusual suspect. *Res. Microbiol.* 168, 826–836. doi: 10.1016/j.resmic.2017.09.003
- Vanechoutte, M. (2017b). The human vaginal microbial community. *Res. Microbiol.* 168, 811–825. doi: 10.1016/j.resmic.2017.08.001
- Voigt, R. M., Forsyth, C. B., Green, S. J., Mutlu, E., Engen, P., Vitaterna, M. H., et al. (2014). Circadian disorganization alters intestinal microbiota. *PLoS One* 9:e97500. doi: 10.1371/journal.pone.0097500
- Volcan, S., Martinez, D., Elli, M., Brun, P., Longo, S., Porzionato, A., et al. (2008). *Lactobacillus crispatus* M247-derived H2O2 acts as a signal transducing molecule activating peroxisome proliferator activated receptor-gamma in the intestinal mucosa. *Gastroenterology* 135, 1216–1227. doi: 10.1053/j.gastro.2008.07.007
- von Schillde, M. A., Hörmannspurger, G., Weiher, M., Alpert, C. A., Hahne, H., Bäuerl, C., et al. (2012). Lactocin secreted by *Lactobacillus* exerts anti-inflammatory effects by selectively degrading proinflammatory chemokines. *Cell Host Microbe* 11, 387–396. doi: 10.1016/j.chom.2012.02.006

- Vrieze, A., Van Nood, E., Holleman, F., Salojärvi, J., Kootte, R. S., Bartelsman, J. F., et al. (2012). Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology* 143, 913–916.e7. doi: 10.1053/j.gastro.2012.06.031
- Wang, H., Lee, I. S., Braun, C., and Enck, P. (2016). Effect of probiotics on central nervous system functions in animals and humans: a systematic review. *J. Neurogastroenterol. Motil.* 22, 589–605. doi: 10.5056/jnm16018
- Wang, S., Hibberd, M. L., Pettersson, S., and Lee, Y. K. (2014). Enterococcus faecalis from healthy infants modulates inflammation through MAPK signaling pathways. *PLoS One* 9:e97523. doi: 10.1371/journal.pone.0097523
- Wang, Y. S., Wu, T. H., Yang, Y., Zhu, C. L., Ding, C. L., and Dai, C. C. (2016). Binding and detoxification of chlorpyrifos by lactic acid bacteria on rice straw silage fermentation. *J. Environ. Sci. Health B* 51, 316–325. doi: 10.1080/03601234.2015.1128744
- Xia, X., Zheng, D., Zhong, H., Qin, B., Gurr, G. M., Vasseur, L., et al. (2013). DNA sequencing reveals the midgut microbiota of diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) and a possible relationship with insecticide resistance. *PLoS One* 8:e68852. doi: 10.1371/journal.pone.0068852
- Yanagida, F., Chen, Y. S., and Yasaki, M. (2007). Isolation and characterization of lactic acid bacteria from lakes. *J. Basic Microbiol.* 47, 184–190. doi: 10.1002/jobm.200610237
- Younan, S., Sakita, G. Z., Albuquerque, T. R., Keller, R., and Bremer-Neto, H. (2016). Chromium(VI) bioremediation by probiotics. *J. Sci. Food Agric.* 96, 3977–3982. doi: 10.1002/jsfa.7725
- Yu, L., Zhai, Q., Yin, R., Li, P., Tian, F., Liu, X., et al. (2017). *Lactobacillus plantarum* CCFM639 alleviate trace element imbalance-related oxidative stress in liver and kidney of chronic aluminum exposure mice. *Biol. Trace Elem. Res.* 176, 342–349. doi: 10.1007/s12011-016-0843-8
- Yun, S. I., Park, H. O., and Kang, J. H. (2009). Effect of *Lactobacillus gasseri* BNR17 on blood glucose levels and body weight in a mouse model of type 2 diabetes. *J. Appl. Microbiol.* 107, 1681–1686. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04350.x
- Zhai, Q., Wang, G., Zhao, J., Liu, X., Narbad, A., Chen, Y. Q., et al. (2014). Protective effects of *Lactobacillus plantarum* CCFM8610 against chronic cadmium toxicity in mice indicate routes of protection besides intestinal sequestration. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 4063–4071. doi: 10.1128/AEM.00762-14
- Zhai, Q., Wang, G., Zhao, J., Liu, X., Tian, F., Zhang, H., et al. (2013). Protective effects of *Lactobacillus plantarum* CCFM8610 against acute cadmium toxicity in mice. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 1508–1515. doi: 10.1128/AEM.03417-12
- Zhou, F. X., Chen, L., Liu, X. W., Ouyang, C. H., Wu, X. P., Wang, X. H., et al. (2012). *Lactobacillus crispatus* M206119 exacerbates murine DSS-colitis by interfering with inflammatory responses. *World J. Gastroenterol.* 18, 2344–2356. doi: 10.3748/wjg.v18.i19.2344

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 George, Daniel, Thomas, Singer, Guilbaud, Tessier, Revol-Junelles, Borges and Foligné. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Article de résultats expérimentaux issus des travaux de thèses



Article

Assessment of Pb(II), Cd(II), and Al(III) Removal Capacity of Bacteria from Food and Gut Ecological Niches: Insights into Biodiversity to Limit Intestinal Biodisponibility of Toxic Metals

Fanny George¹, Séverine Mahieux¹, Catherine Daniel², Marie Titécat¹, Nicolas Beauval^{3,4}, Isabelle Houcke¹, Christel Neut¹ , Delphine Allorge^{3,4} , Frédéric Borges⁵, Gwénaél Jan⁶, Benoît Foligné^{1,*,†} and Anne Garat^{3,4,†}



Citation: George, F.; Mahieux, S.; Daniel, C.; Titécat, M.; Beauval, N.; Houcke, I.; Neut, C.; Allorge, D.; Borges, F.; Jan, G.; et al. Assessment of Pb(II), Cd(II), and Al(III) Removal Capacity of Bacteria from Food and Gut Ecological Niches: Insights into Biodiversity to Limit Intestinal Biodisponibility of Toxic Metals. *Microorganisms* **2021**, *9*, 456. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020456>

Academic Editor: Wilhelm Holzapfel

Received: 25 January 2021

Accepted: 18 February 2021

Published: 22 February 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- ¹ U1286–INFINITE-Institute for Translational Research in Inflammation, Institut Pasteur de Lille, CHU Lille, Université de Lille, F-59000 Lille, France; fanny.george@univ-lille.fr (F.G.); severine.mahieux@univ-lille.fr (S.M.); marie.titecat@univ-lille.fr (M.T.); isabelle.houcke@univ-lille.fr (I.H.); christel.neut@univ-lille.fr (C.N.)
 - ² U1019-UMR 9017–Center for Infection and Immunity of Lille, Institut Pasteur de Lille, CHU Lille, Université de Lille, F-59000 Lille, France; catherine.daniel@ibl.cnrs.fr
 - ³ ULR 4483-IMPECS-IMPact de l'Environnement Chimique sur la Santé humaine, Institut Pasteur de Lille, CHU Lille, Université de Lille, F-59000 Lille, France; nicolas.beauval@chru-lille.fr (N.B.); delphine.allorge@univ-lille.fr (D.A.); anne.garat@univ-lille.fr (A.G.)
 - ⁴ Unité fonctionnelle de Toxicologie, Institut Pasteur de Lille, CHU Lille, Université de Lille, F-59000 Lille, France
 - ⁵ LIBio, Université de Lorraine, F-54000 Nancy, France; frederic.borges@univ-lorraine.fr
 - ⁶ STLO, INRAE, Agrocampus Ouest, Institut Agro, Science & Technologie du Lait & de l'Œuf, F-35042 Rennes, France; gwenaél.jan@inrae.fr
- * Correspondence: benoit.foligne@univ-lille.fr; Tel.: +33-621741015
† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Toxic metals (such as lead, cadmium, and, to a lesser extent, aluminum) are detrimental to health when ingested in food or water or when inhaled. By interacting with heavy metals, gut and food-derived microbes can actively and/or passively modulate (by adsorption and/or sequestration) the bioavailability of these toxins inside the gut. This “intestinal bioremediation” involves the selection of safe microbes specifically able to immobilize metals. We used inductively coupled plasma mass spectrometry to investigate the in vitro ability of 225 bacteria to remove the potentially harmful trace elements lead, cadmium, and aluminum. Interspecies and intraspecies comparisons were performed among the Firmicutes (mostly lactic acid bacteria, including *Lactobacillus* spp., with some *Lactococcus*, *Pediococcus*, and *Carnobacterium* representatives), Actinobacteria, and Proteobacteria. The removal of a mixture of lead and cadmium was also investigated. Although the objective of the study was not to elucidate the mechanisms of heavy metal removal for each strain and each metal, we nevertheless identified promising candidate bacteria as probiotics for the intestinal bioremediation of Pb(II) and Cd(II).

Keywords: bioremediation; gut microbiota; lactic acid bacteria; Enterobacterales; lead; cadmium; aluminum; probiotics; ICP-MS

1. Introduction

Hazardous toxic metals (such as lead (Pb), cadmium (Cd), and, to a lesser extent, aluminum (Al)) are nonessential and nonbiodegradable elements that are detrimental for health through (i) poisoning after acute environmental exposure, (ii) long-term, low-dose contamination via the food chain, or (iii) inhalation. When considering the exposome in humans and other animals, heavy metals and other toxins can enter the body by the oral route after the inhalation or ingestion of contaminated drinking water, beverages, or food.

After first interacting with the gastrointestinal tract and its ecosystem, the metals may accumulate further within target tissues and also reach the circulation [1,2].

Lead (Pb) is a widespread heavy metal considered to be “probably carcinogenic” by the US Environmental Protection Agency (EPA) and classified as a group 2A substance by the International Agency for Research on Cancer (IARC). Chronic Pb exposure leads to anemia, increased blood pressure, persistent vomiting, and neuropsychiatric disorders (including encephalopathy, delirium, convulsions, and even coma in severe cases) [3,4]. It is noteworthy that children are highly susceptible to Pb exposure, which may cause mental retardation [5]. Recent studies have suggested that Pb exposure in childhood is a risk factor for the development of neurodegenerative diseases in adulthood [6]. Pb accumulates mostly in the liver, kidneys, and bones. Safe drinking water should contain less than $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Pb—a threshold that is very often exceeded [7].

Cadmium (Cd) is classified as a group I carcinogenic compound by the IARC [8]. The metal is nephrotoxic and may induce various health disorders, such as damage to bones (osteoporosis), kidney tubules, the brain, and the testis [9–11]. It has also been suggested that Cd is involved in metabolic diseases and susceptibility to respiratory tract infections [12,13]. A Cd intake of $23.2 \mu\text{g}/\text{day}$ (less than half the safe intake, according to current guidelines) might increase the risk of chronic kidney disease, mortality from heart disease, cancer at any site, and Alzheimer’s disease [14]. Moreover, epidemiological studies of co-exposure to Cd and Pb have shown that each metal enhances the nephrotoxicity of the other. Furthermore, Cd is also involved in the modulation of inflammatory responses [15], including those in the gastrointestinal tract [16]. Perinatal and early-life exposure to Cd has been linked to poor birth outcomes and adverse effects on the child’s neurodevelopmental and metabolic functions [17].

Aluminum (Al) has no known physiological functions and accumulates in the liver, kidneys, bones, testis, and (where it produces the most prominent toxic effects) the brain and the nervous system [18,19]. It has also been suggested that Al is involved in neurological disorders, such as Alzheimer’s disease, autism spectrum disorders, and multiple sclerosis [20]. With regard to the digestive tract, Al induces epithelial barrier dysfunction, abdominal pain, and inflammation [21,22], and the metal’s involvement in inflammatory bowel disease is strongly suspected [23–25]. Al adversely affects reproduction [25], and in utero exposure has a negative impact even at low concentrations [26].

Furthermore, ingested metal xenobiotics may also contribute to dysbiosis by targeting the host’s gut microbiota and the latter’s key functional roles in intestinal homeostasis [16,27]. Hence, metal contaminants may indirectly alter the host’s health as a result of subtle microbial changes within the gut [28,29]; these changes might damage the intestine’s barrier functions and might contribute to a broad range of metabolic, neurological, and/or chronic immune diseases. Indeed, microbes interact (by biotransformation or sequestration) with metals in the gut, and thus can actively or passively, control bioaccessibility and the further bioavailability of heavy metals [30]. In experiments on germ-free mice [2,31] or involving broad-spectrum antibiotics [32], we and others have previously highlighted the gut microbiota’s overarching role as a barrier to heavy metal dissemination. However, not all bacteria have the same ability to limit the bioavailability of toxic metals. Whereas the use of environmental bacteria as biosorbents for heavy metals has been widely employed to remove metals from contaminated soils and wastewaters [33], “intestinal bioremediation” requires the selection of safe microbes on the basis of their specific ability to immobilize metals [34]. Given their ecological niches, food-grade bacteria and gut-sourced microorganisms are thus the best candidates for alleviating metal toxicity [35]. In this context, lactic acid bacteria (LAB) efficiently bind and/or internalize metals (especially Cd and Pb) in vitro [36–40].

Although LAB-mediated metal removal is partly strain-dependent, few researchers have explored species and strain diversity in this respect. Overall, only a few types of LAB (lactobacilli, enterococci, and *Weissella* spp. [40–42]), dairy propionibacteria, and bifidobacteria [38,43] have been analyzed in separate, heterogenous studies. Furthermore,

non-LAB have rarely been screened for these properties: only a small number of proteobacterial species (*E. coli*) and gut-isolated anaerobic bacteria (*Akkermansia muciniphila*, *Faecalibacterium prausnitzii*, and *Oscillibacter ruminantium* single strain isolates) have been studied [32,43]. Other genera with notable in vitro detoxification potential (such as *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, or *Bacillus*) are not appropriate for targeting the intestinal compartment. To date, only LAB such as *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and *Lactobacillus delbrueckii* strains have been selected in vitro and then confirmed as being able to detoxify in vivo. Various selected food-sourced microbes can prevent the absorption of heavy metals in the gut (and thus dissemination into the tissues) and thus enable their excretion in the feces. The efficacy of this approach has been demonstrated in preclinical studies of acute and chronic Pb [32,44,45], Cd [46,47], and Al [48,49] toxicity in the mouse.

Among probiotic lactobacilli, cell-surface-associated compounds are responsible for the strains' functional specificity [50]. The mechanism by which metals bind to the bacterial cell wall is thought to depend on the huge variety of surface molecules on individual bacterial species and strains [51], including teichoic and lipoteichoic acids and peptidoglycans. One can therefore hypothesize that the distinct biosorbent properties of other Gram-positive and Gram-negative bacteria depend on binding sites such as S-layer proteins, cell surface proteins, and polysaccharides.

Here, we assessed interspecies and interstrain variability in the ability to remove potentially harmful Pb, Cd, and Al in vitro. The study's primary objective was to compare intrinsic aptitudes to cope with heavy metals among bacteria from the Firmicutes, Actinobacteria, and Proteobacteria, rather than to elucidate the mechanisms of metal biosorption or bioaccumulation per se (e.g., plotting adsorption isotherms). We studied many LAB ($n = 99$), several bifidobacteria ($n = 11$), dairy propionibacteria ($n = 21$), and cutibacteria ($n = 4$), together with other gut-friendly bacteria such as the Enterobacterales ($n = 90$). The study's secondary objective was to identify the best candidates for use in preclinical assays and further veterinary and clinical applications.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals, Reagents and Instruments

Chemicals and reagents were purchased from Sigma-Aldrich Chemical (Saint-Quentin-Fallavier, France), unless otherwise stated. Ultrapure water corresponds to PURELAB Option-Q from Veolia Water (Antony, France). The Ultraflex III matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight (MALDI-TOF/TOF) instrument and Flex Analysis software were from Bruker Daltonik GmbH (Bremen, Germany). Metal concentrations in diluted samples were determined using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS; THERMO ICAP Qc, Thermo Scientific, Courtaboeuf Cedex, France).

2.2. Bacterial Strains Collections and Culture Conditions

We studied a set of 225 bacterial strains from various sources. Most of the LAB came from the well-characterized DSM and ATCC collections previously used for comparative genomics studies of lactobacilli and associated genera [52].

The Propionibacteria sample consisted of 21 *Propionibacterium freudenreichii* strains from the Centre International de Ressources Microbiennes-Bactéries d'Intérêt Alimentaire collection (CIRM-BIA; STLO, Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement, Rennes, France), previously characterized for their immunomodulatory potential using comparative genomics [53].

Most of the *Escherichia coli* strains belonged to the *Escherichia coli* ECOR standard reference collection [54]. The latter includes isolates (A, B1, B2, D, and E phylogroups) from a variety of hosts and geographic regions and were kindly provided by Dr. Laurent Debarbieux (Institut Pasteur, Paris, France). Other *E. coli*-type strains and adherent invasive *E. coli* pathovars (AIEC) have been described previously [55]. Strains of *Serratia marcescens* (Db10, JUb9, SM25, SM38, and SM45) were kindly provided by Dr. Elizabeth Pradel

(Institut Pasteur de Lille, Lille, France) [56]. Some cheese-derived *Hafnia alvei* strains (Gb01, E215, 920 and Grignon) have been described elsewhere [57]. Lastly, a few bacterial strains (nine *Bifidobacterium* species, four *Cutibacterium acnes*, two *Enterobacter*, two *Hafnia alvei*, and five *Klebsiella*) were sourced from historical clinical gut or fecal samples of human origin, from food, or as re-isolates from commercial probiotic products (Bb12 and Morinaga) held in a collection at the Faculty of Pharmacy of Lille (FPL collection), University of Lille, France. The strains were identified using selective media and then MALDI-TOF and were denoted by internal FPL numbers.

Strains of *Lactobacillus* and associated genera (*Fructobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, and *Weissella*) were cultured without shaking in de Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) medium, and *Carnobacterium* and *Staphylococcus* were cultured in BHI (brain heart infusion) at 30 or 37 °C, depending on their optimal growth temperature. Bifidobacteria were grown anaerobically using anaerobic generator packs (GENbaganaer, Biomérieux, France) in MRS supplemented with 0.1% (*w/v*) L-cysteine hydrochloride. *P. freudenreichii* strains were grown at 30 °C under microaerophilic conditions and without shaking in yeast extract lactate medium [58]. Strains of Enterobacterales (*Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, and *Serratia*) were grown in Luria–Bertani medium at 37 °C without shaking. Depending on the bacterial strain, the stationary phase was achieved after 12 to 72 h of culture.

2.3. Metal Removal Assays

Eight mL of a stationary-phase bacterial culture was standardized at an optical density at 600 nm of 2.5 and then washed twice in Ringer's solution. The pellet was suspended with 8 mL of the corresponding metal ion solution (in Ringer's, pH 7.0) containing 25 ppm (PbCl_2 or AlCl_3) or 1 ppm CdCl_2 and then gently mixed using a rotary agitator (12 rpm) at room temperature for 1 h. Samples were then centrifuged and washed twice before quantification of the amount of metal using ICP-MS. The pellets were suspended in 500 μL of 70% nitric acid and heated at 98 °C for 15 min. Lastly, the samples were diluted in mQ water and assayed using ICP-MS. For each strain, the residual metal mass in the pellet was expressed as a percentage of the initial amount in the incubation medium. All assays were performed in triplicate, corresponding to three distinct bacterial cultures. The bacteria–metal incubation time was set to one hour in order to mimic the food transit time and thus the possible contact time in the gut.

We first checked that our methods were reliable and appropriate for screening distinct bacterial strains for their ability to remove Pb, Cd, or Al. It is known that many factors influence the levels of metal binding by bacteria: the contact time, temperature, pH, metal ion concentration, washing buffer, and inoculum size [36,59,60]. Thus, several key parameters were defined to either mimic the gut environment or for reasons of convenience, e.g., the incubation temperature. The binding assay was thus performed in physiological saline solution (Ringer's solution) at a neutral pH (7.1) and at room temperature (22 ± 2 °C), using time-separated (triplicate) cultures to test the reproducibility. Pb and Al concentration at 25 ppm were selected as being realistic for evaluating metal sequestration, whereas a lower concentration of Cd (1 ppm) was required for discrimination between strains. In fact, 25 ppm Cd did not discriminate between strains—most of which had very low Cd binding capacity (removal < 5%) in an initial prescreen. Consequently, only the most promising strains (removal > 5%) were assessed at 1 ppm. It is noteworthy that the selected concentrations of Pb, Cd, and Al were similar to those reported previously [40,43,49,51]. We therefore ranked a strain's removal capacity as “weak”, “low”, “moderate”, or “high” (respectively, 0–25%, 26–50%, 51–75%, and 76–100% for Pb, and 0–10%, 11–20%, 21–30%, and >30% for Cd and Al).

The screening assay was based on the percentage of metal bound strongly to the pelleted bacteria. However, we also confirmed the stability and irreversibility of binding in order to further discriminate between strains that bound both Pb and Cd. To this end, we performed two serial wash cycles (resuspension of the pellet in a metal-free solution and

then centrifugation). In fact, the residual quantities of metal in the second and last wash samples were barely detectable or undetectable. This is illustrated by selected examples of strains with different binding efficiencies (Figure S1A,B). However, the Al binding was more labile and appeared to be partly reversible after rinsing, although the serial wash cycle was quite reproducible (Figure S1C). Consequently, our assay somewhat overestimated Al binding but enabled us to discriminate between strains; the assay result might reflect the bacteria's intrinsic ability to interact with the metal under physiological conditions, i.e., in the gastrointestinal tract.

2.4. Statistical Analyses

All graphical and statistical analyses were performed with GraphPad Prism software (version 6.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Experimental groups were compared with their respective controls in a nonparametric, one-way analysis of variance (the Mann–Whitney U test) or a two-tailed Student's *t*-test, as appropriate. Quantitative variables were quoted as the mean $\pm$ standard deviation (SD). Data with *p* values ≤ 0.05 were considered to be significant.

3. Results

3.1. Lactic Acid Bacteria (LAB) Exhibit Variable Pb Removal Capacities

Among the 99 individual LAB strains tested for their capacity to remove Pb(II) salts at 25 ppm, over two-thirds were able to immobilize between 50% and 90% of the metal in solution (Figure 1A). When considering only the genus *Lactobacillus* (covering 65 distinct species and 76 strains), the removal capacity of Pb ranged from $6\% \pm 2.5$ to $92\% \pm 8.5$. The species-level patterns were inconsistent: marked interstrain differences could be observed for given species, such as *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei* and *L. rhamnosus* (Figure 2A). The two *L. fermentum* strains were particularly effective for Pb removal, whereas the two *L. plantarum* strains were unexpectedly poor (Figure 2B).

The Pb removal capacity also varied within other species of LAB. *Carnobacterium* spp., *Pediococcus* spp., *Leuconostoc*, *Fructobacillus*, and *Weissella* spp. demonstrated high Pb removal capacities (Figure 2C). This potential was not related to the bacteria's shape (i.e., bacilli vs. cocci); the three enterococci and four pediococci tested were quite good Pb biosorbers ($>50\%$), whereas *Lactococcus lactis* and four distinct strains of *Staphylococcus aureus* were not (mostly $<30\%$) (Figure 2D).

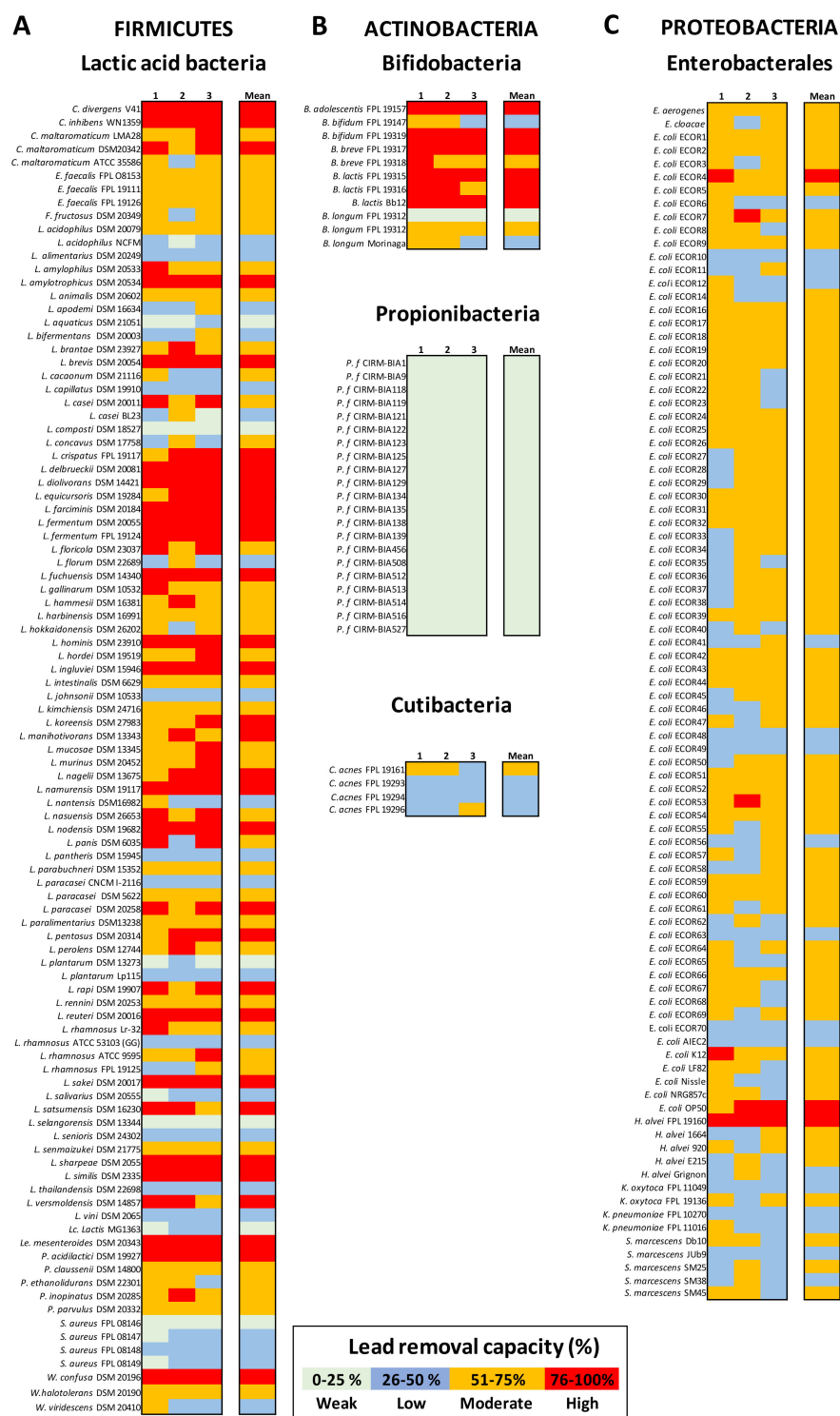


Figure 1. The Pb(II) removal capacity of bacteria from distinct taxonomic phyla. Panel (A): Lactic acid bacteria (LAB). Panel (B): Actinobacteria, comprising bifidobacteria, propionibacteria, and cutibacteria. Panel (C): Proteobacteria, such as the Enterobacterales. Metal removal capacity is defined as the mean $\pm$ SD percentage of the initial quantity of metal in solution, in triplicate experiments. Here, the Pb removal capacity is color-coded as weak (0 to 25%: pale green), low (26 to 50%: blue), moderate (51 to 75%: orange), or high (76 to 100%: red).

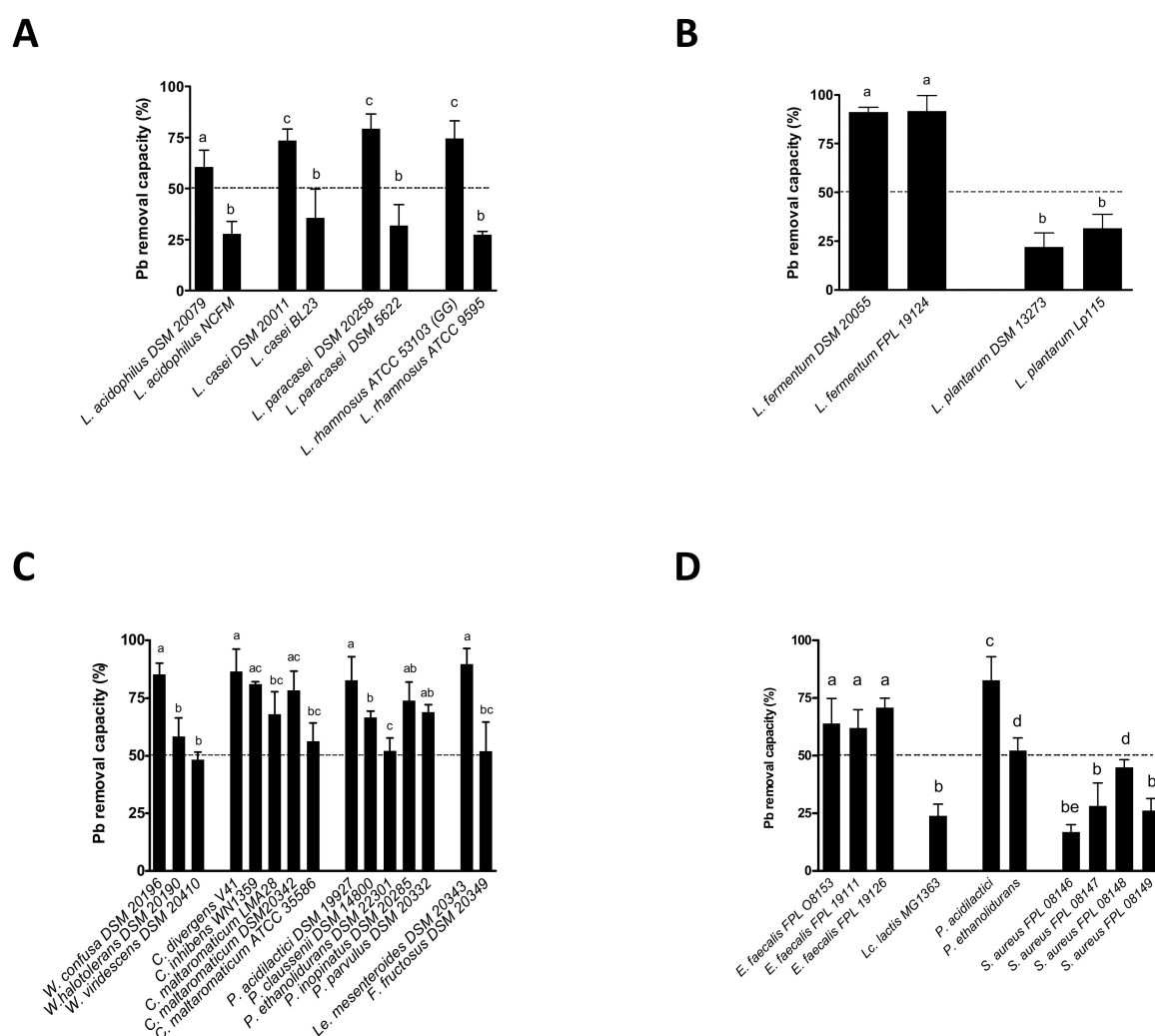


Figure 2. The Pb(II) removal capacity of distinct strains of LAB. Panel (A): Five selected pairs of strains from the same species but with distinct removal capacities. Panel (B): Two selected pairs of strains from the same species but with similar removal capacities. Panel (C): Four selected groups of strains from the same genus but with distinct removal capacities. Panel (D): Four selected strains from groups of cocci with distinct removal capacities. Metal removal capacity was defined as the mean $\pm$ SD percentage of the initial quantity of metal in solution, in triplicate experiments. Different letters indicate significant ($p < 0.05$) between-strain differences.

3.2. Actinobacteria Strains Differ in Their Pb Biosorption Potential

Within the Actinobacteria, the bifidobacteria's Pb removal capacities ranged from weak (e.g., 6.6%) to high (e.g., 90%), depending on the strain (Figure 1B). Interstrain differences were observed for all species; for example, some *Bifidobacterium longum* strains had a removal capacity of up to 10-fold more than others (i.e., $6.75\% \pm 0.9$ vs. $65.4\% \pm 7.2$; $p < 0.001$). Surprisingly, none of the *Propionibacterium freudenreichii* strains of dairy origin were able to remove much Pb (mean: $10.25\% \pm 4.4$). In contrast, four *Cutibacterium acnes* strains (previously referred to as *Propionibacterium acnes*) had removal capacities of 41%, 44%, 49%, and 56.8%, respectively.

3.3. Enterobacterales Have a Moderate Pb Biosorption Potential

We evaluated 90 strains belonging to the class of Gammaproteobacteria and to the order of Enterobacterales, comprising 68 *E. coli* strains from the ECOL library, extended to five other *E. coli* strains showing either probiotic properties (*E. coli* Nissle 1917), pathobiont traits such as adherent and invasive capacities, e.g., LF82 and NRG857C, or no particular

criterion from a physiological point of view (*E. coli* K12). Furthermore, other genera were considered, with five dairy isolates of *Hafnia alvei*, two *Klebsiella* spp., two *Enterobacter* spp., and five *Serratia marcescens* strains from clinical collections, as commensal prototypes. Overall, the Enterobacterales strains' ability to remove Pb was moderate and uniform ($54.14 \pm 6.7\%$). Indeed, nearly 90% of the strains of Gram-negative bacilli had Pb removal capacities between 45% and 65%. Only two *E. coli* strains and a single *Hafnia alvei* strain were able to immobilize more than 75% of the Pb in a 25 ppm solution.

3.4. Bacterium-Mediated Cd Removal Capacity Is Phylum-, Genus-, and Strain-Specific

As explained in the Methods section, the Cd concentration of 25 ppm was not appropriate for discriminating between bacterial strains with respect to Cd(II) binding or for mimicking real intoxication events. Hence, we tested the bacteria's ability to remove Cd from a 1 ppm solution. Among the 95 LAB strains tested, (90%) removed Cd weakly (<20% binding; Figure 3A). Interestingly, a few strains (three *Pediococcus* spp., a *Carnobacterium divergens* strain, and, to a lesser extent, a *L. rhamnosus* strain and a *Leuconostoc mesenteroides* strain) had Cd binding capacities over 25% and even up to $50\% \pm 15.7$ for a *Pediococcus acidilactici* isolate.

When considering the Actinobacteria, the bifidobacteria were characterized by variable Cd removal that depended more on the strain than on the species. Indeed, the removal capacity of *Bifidobacterium breve* strains ranged from $6.2\% \pm 0.6$ to $40.7\% \pm 6.7$ ($p < 0.01$), and that of *B. longum* strains ranged from $3.6\% \pm 1.7$ to $18.9\% \pm 5.8$ ($p < 0.01$). Most of the *Propionibacterium freudenreichii* strains were consistently weak Cd biosorbers, whereas *C. acnes* strains removed Cd poorly or moderately (Figure 3B). Lastly, near all the 60 Enterobacterales tested were weak or low Cd chelators, with the exception of four *E. coli* strains with a moderate Cd removal potential (ECOR 64, ECOR 66, *E. coli* LF82, and *E. coli* Nissle, with values of $24.2\% \pm 3.6$, $21.2\% \pm 5.6$, $20.5\% \pm 2.2$, and $25.2\% \pm 3.5$, respectively) (Figure 3C).

3.5. Bacteria-Mediated Al Removal Capacity Is Also Genus- and Strain-Dependent

The bacteria's ability to remove Al(III) in AlCl_3 solution depended on the strain's origin and phylogenetic diversity. The LAB's ability to remove Al from a 25 ppm solution differed from one species to another; it ranged from 5% to 28%, with an average of $14.8\% \pm 4.7$ (Figure 4A). Similarly, bifidobacteria and propionibacteria bound Al quite weakly (mean: $8.9\% \pm 2.8$ and $9.4\% \pm 2.6$, respectively), and the values rarely exceeded 10%. Strains of *Cutibacterium acnes* were more effective, with moderate removal capacities (mean: $24.3\% \pm 4.7$) (Figure 4B). In contrast, representatives of Enterobacterales had removal capacities that ranged from 12% to 30%, with a mean value of $20.4 \pm 4.7\%$ (Figure 4C). A few *E. coli* strains removed Al strongly (i.e., 25% to 30% for ECOR37, ECOR40, ECOR50, and ECOR64). The *Hafnia* and *Serratia* strains were less effective, with values below 15%.

3.6. The Ability of Bacteria to Remove Pb and Cd Is Not Greatly Affected When Both Metals Are Present

Given that co-exposure to Pb and Cd is commonly (due to their co-occurrence in food, water, and the environment more generally), we also assayed removal capacities when the two metals were present (i.e., a solution containing 25 ppm Pb and 1 ppm Cd) for 16 arbitrarily selected Gram-positive bacteria (Figure 5A) and 16 arbitrarily selected Gram-negative bacteria (Figure 5B). Interestingly, the bacteria's removal capacity for one metal was not greatly influenced by the presence of the other—except for few strains showing a relative decrease of 20% to 40% vs. the metal alone.

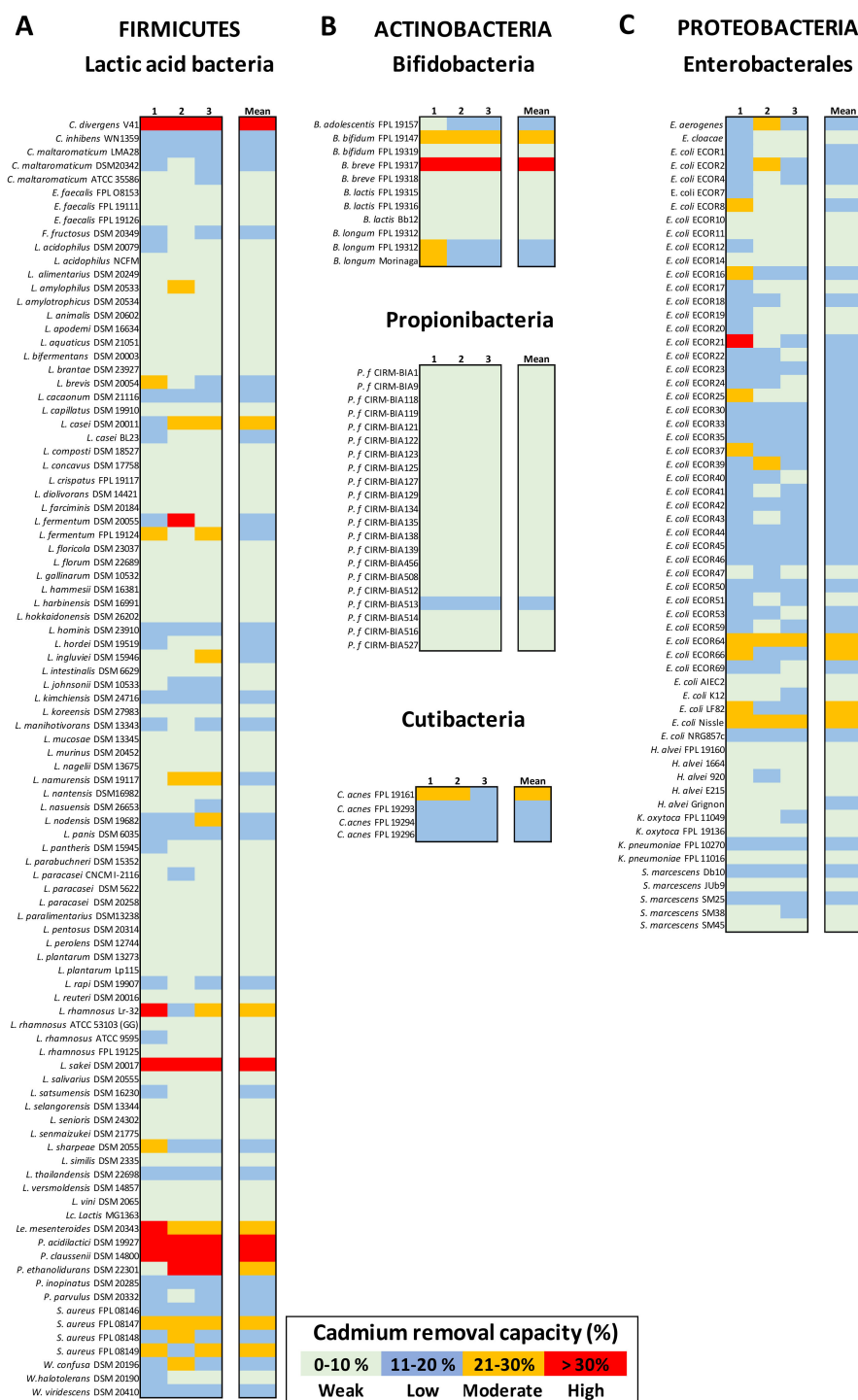


Figure 3. The Cd(II) removal capacity of bacteria from distinct taxonomic phyla. Panel (A): LAB. Panel (B): Actinobacteria, comprising bifidobacteria, propionibacteria, and cutibacteria. Panel (C): Proteobacteria, as Enterobacterales. Metal removal capacity was defined as the mean $\pm$ SD percentage of the initial quantity of metal in solution, in triplicate experiments. Here, the Cd removal capacity is color-coded as weak (0 to 10%: pale green), low (11 to 20%: blue), moderate (21 to 30%: orange), or high (over 30%: red).

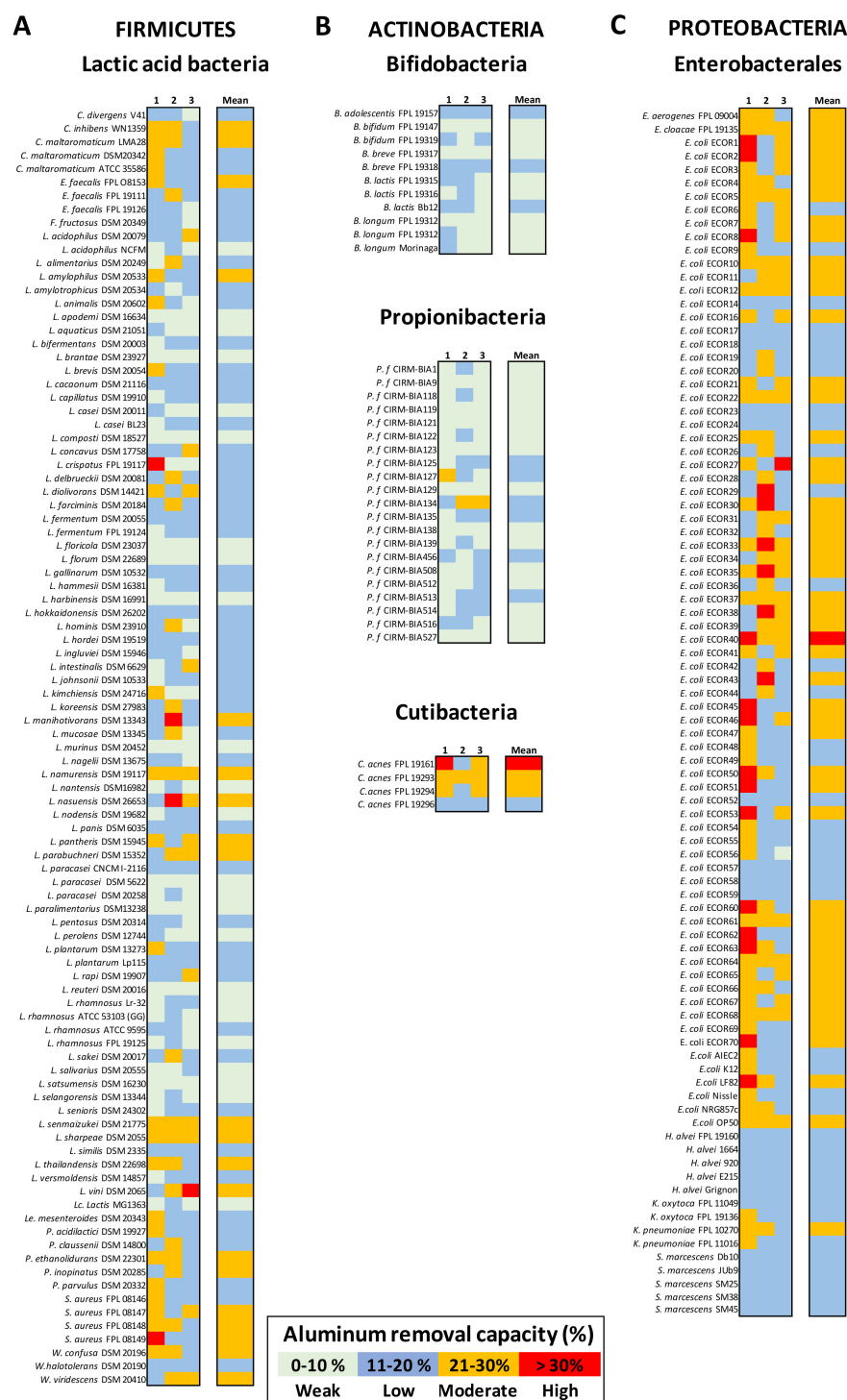


Figure 4. Al(III) removal capacity of bacteria from distinct taxonomic phyla. Panel (A): LAB. Panel (B) Actinobacteria, comprising bifidobacteria, propionibacteria, and cutibacteria. Panel (C): Proteobacteria, such as the Enterobacterales. Metal removal capacity was defined as the mean $\pm$ SD percentage of the initial quantity of metal in solution, in triplicate experiments. Here, the Al removal capacity is color-coded as weak (0 to 10%: pale green), low (11 to 20%: blue), moderate (21 to 30%: orange), or high (over 30%: red).

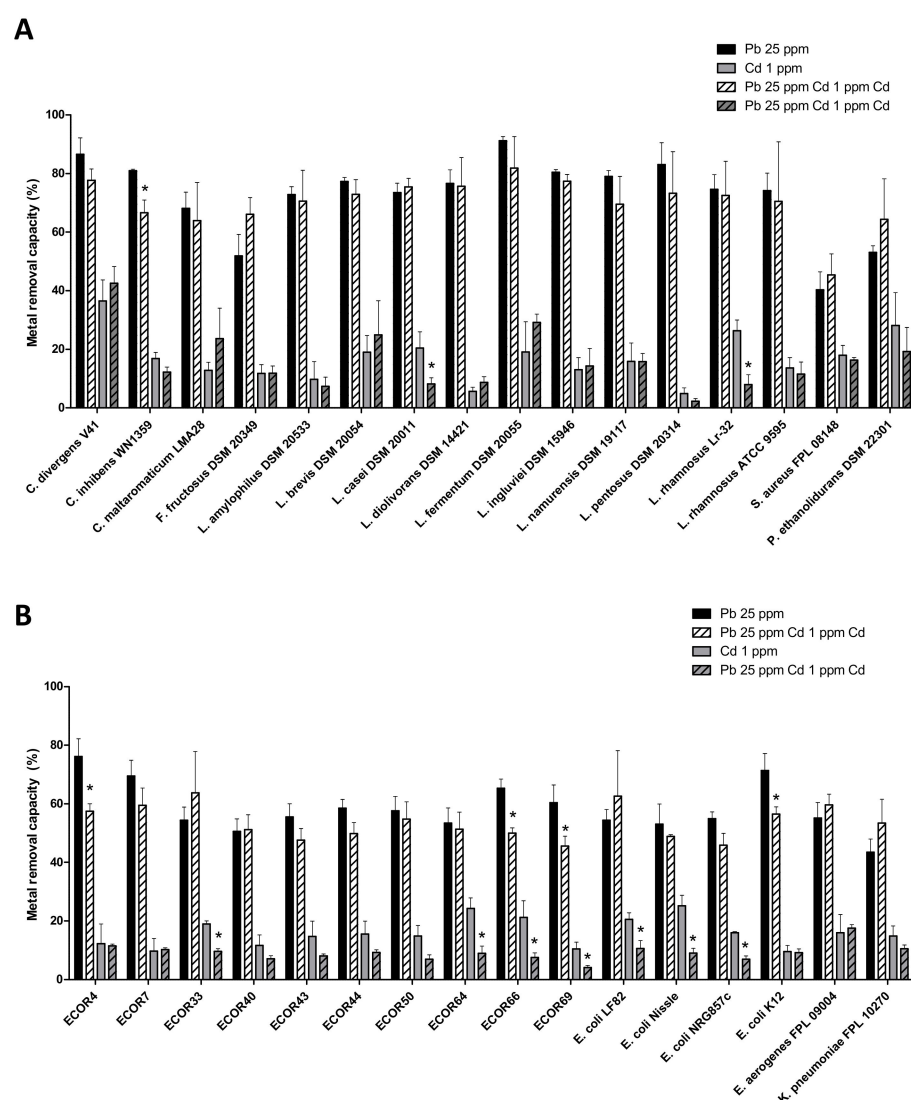


Figure 5. Pb removal capacities for 25 ppm Pb alone (black) or with 1 ppm Cd (hatched black) and Cd removal capacities for 1 ppm Cd alone (in grey) or with 25 ppm Pb (hatched grey). Panel (A): Lactic acid bacteria and other Gram positive bacteria. Panel (B): Enterobacterales. Metal removal capacity was defined as the mean $\pm$ SD percentage of the initial quantity of metal in solution, in triplicate experiments. * indicates a statistically significant ($p < 0.05$) difference between the metal alone and the metal in a mixture.

4. Discussion

Here, we addressed the Pb, Cd, and Al removal capacity of more than 200 bacterial strains; these were mostly LAB, associated genera, and representative gut enterobacteria. It is noteworthy that all the tested bacteria were able to survive at the studied metal concentrations (i.e., 25 ppm for Pb and Al and 1 ppm for Cd), as previously described elsewhere for several LAB strains [40]. Indeed, all the tested strains survived exposure to Pb concentrations of more than 1000 ppm. The strains' respective Cd removal capacities were not correlated with the (higher) minimal inhibitory concentration (MIC). When considering strains with a MIC of 34.5 ppm (for example), the Cd removal capacity ranged from 1.5% to 23.6% (Figure S2). This observation suggests that metal tolerance is not a guide to metal removal, as has also been demonstrated for Pb with various *L. plantarum* strains [61]. Live bacteria are not necessarily required for significant metal biosorption. Indeed, binding isotherms in the Langmuir model showed that the maximum binding capacity (Q_{max}) was high for both boiled (dead) and live forms of two probiotic strains (*Lactobacillus rhamnosus*

and *Propionibacterium freudenreichii*) [36]. Other researchers have demonstrated that dead and live bacteria have similar binding capacities for Pb and for Cd [32,36,41,42]. However, live forms are slightly more effective for Pb removal as a result of cell-specific intracellular metal accumulation [62,63].

Approaches based on the lactobacilli's surface characteristics (such as hydrophobicity and electrostatic properties) failed to identify relevant selection criteria for Pb and Cd removal [64]. Indeed, we currently lack hypothesis-driven criteria for selecting strains with a high detoxification capacity. In the present hypothesis-free study, we characterized the removal metal capacity of live bacteria with regard to species and strain diversity. We used gut-friendly (nonpathogenic) bacteria sourced from food for from intestinal ecological niches. Most of these bacteria are "generally regarded as safe" by the US Food and Drug Administration—the GRAS status and safety in general being an essential characteristic for further in vivo applications. In contrast to many studies of metal removal from solutions in deionized water, we used neutral, isotonic Ringer's solution for the binding assays and the washing cycles.

Our present results for metal removal confirm and extend the broad spectrum of functional diversity observed among Gram-positive and Gram-negative bacteria. The mechanisms of metal removal are strain-dependent and have been described elsewhere [52,65]; they include ion exchange, chelation, adsorption by physical forces, and intracellular sequestration. The role of hydroxyl (from the peptidoglycan), carboxyl, and phosphate (surface protein) groups is influenced by pH, specificity, and abundance; along with capsular polysaccharides, these are assumed to be the key determinants of metal binding. Thus, a cell's overall removal capacity is a complex, multifactorial variable. Although many variables (e.g., culture conditions, media, and growth phase) are independent of the individual bacterial genes, comparative genomic studies of LAB might help to identify specific genes that are up- or downregulating factors involved in metal removal.

We found that LAB and bifidobacteria have generally moderate to high Pb removal capacities, whereas dairy propionibacteria consistently have weak capacities. Gram-negative bacteria have almost low to moderate Pb removal capacities. We were able to identify some good candidates for Pb removal among the lactobacilli and bifidobacteria, as previously described for *Lactobacillus sakei*, *L. actobacillus delbruckii*, *L. actobacillus fermentum* and *Bifodobacterium bifidum* strains [44]. In line with the literature data, we found that *Weissella* and *Pediococcus* spp. had high Pb removal capacities [40]. To the best of our knowledge, the present study is the first to have described the high Pb removal capacity of *Carnobacterium* spp.

With regard to Cd, five of the 220 strains (one *B. breve* strain, one *L. sakei* strain, one *Carnobacterium divergens* strain and two *Pediococcus* strains) had a high removal capacity—suggesting that some LAB not generally considered to be probiotics may have valuable properties for Cd bioremediation purposes. In contrast to previous reports [44,47], the few *L. rhamnosus* and *L. plantarum* strains in our study exhibited poor Pb and Cd removal capacities. Again, it should be borne in mind that metal removal capacities are highly strain-dependent and species-level generalizations cannot be made. Interestingly, all 20 strains of *Propionibacterium* had similar but low removal capacities for both Pb and Cd, despite the fact that they have very strain-specific surface protein and exopolysaccharide profiles (related to various immunological properties) [65].

There are few published data on Al removal by bacteria. A literature study of *L. plantarum* and *L. actobacillus reuteri* strains [49] with a similar experimental design found a higher removal capacity (25%) than we did. It is noteworthy that the Al removal capacity was consistently higher in *Enterobacteria* than in LAB and *Actinobacteria*.

Interestingly, we found that the bacteria's ability to remove Pb and Cd is not greatly affected when the metals are mixed. This encourages us to select strains able to remove both Pb and Cd to a large extent. It remains to be seen whether or not mixing strains has synergistic effects on Pb and Cd removal [66].

It is proven that bacterial strains with a high metal removal capacity in vitro can also have this potential in in vivo models of acute and chronic poisoning in mice [32,44–47,49], rats [66], and humans [67]. The initial screening described here must now be extended in vivo in order to take account of the physiology of the gastrointestinal tract and the presence of other essential metals, trace elements, and organic molecules. Heavy metal influences the gut microbiota's structure, diversity, and function [28] (including heavy metal sequestration), and prebiotics can interfere with the equilibria of heavy metals too [68]. Thus, the bidirectional relationship of dysbiosis and heavy metals in various pathologies and the use of probiotics are highly complex [27] and will have to be taken into account when developing personalized medicine treatments [69]. Lastly, the strength of metal binding under physiological conditions remains to be determined. Although the bacteria can absorb heavy metals in preclinical models of acute and chronic exposures, possible interactions with food matrices must be addressed. Interestingly, bacteria with good heavy metal removal capacities can also be incorporated into fermented foods. In vitro simulations of gastrointestinal digestion might provide this information and might help to mimic the bioremediation process in the presence of various foods. Nonetheless, it might be possible to use selected exogenous food-grade bacteria to lower heavy metal levels, just as chemical chelators or food-derived fibers can be used to treat metal poisoning. This approach might enable the development of specific probiotics or probiotic-fermented foods for countering exposure to xenobiotics.

5. Conclusions

Taken as a whole, our present results reveal that bacteria are highly diverse in their ability to remove Pb, Cd, Al, or a mixture of Pb and Cd in vitro. By exploring the interspecies and interstrain diversity of LAB, bifidobacteria, propionibacteria, and enterobacteria, we found that bacterial metal removal is strain- and metal-dependent. These results open up several perspectives for further research. Firstly, it may be possible to identify probiotic candidates with a long history of safe use for the human or veterinary treatment of acute heavy metal poisoning or chronic heavy metal contamination, in combination with conventional chelation, antioxidant, and anti-inflammatory therapies. Secondly, our results may help to understand the role of gut-resident microbes in modulating toxic metal levels.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/2076-2607/9/2/456/s1>. Figure S1: Selected examples of bacterial strains with distinct metal removal capabilities, demonstrating the accuracy of the assays for Pb (A), Cd (B), and Al (C). Metals were quantified in the binding supernatant, in the two washing buffers, and in the final bacterial pellet. Figure S2: Selected examples of bacterial strains with equivalent MICs for Cd but different Cd removal capacities, illustrating the lack of a relationship between metal resistance and metal binding. MICs were determined in 24-hr liquid cultures. The Cd removal capacity is color-coded as weak (0 to 10%: pale green), low (11 to 20%: blue), and moderate (21 to 30%: orange).

Author Contributions: Conceptualization, B.F., C.D., and A.G.; methodology, A.G., B.F., M.T., N.B., and F.G.; validation, B.F., F.G., and A.G.; formal analysis, F.G., B.F., A.G., S.M., M.T., I.H.; investigation, F.G., B.F., S.M., and I.H.; resources, C.N., F.B., M.T., G.J., and D.A.; data curation, F.G., B.F., and A.G.; writing—original draft preparation, F.G., B.F., and A.G.; writing—review and editing, F.G., B.F., C.D., A.G., F.B., D.A., and G.J.; supervision, B.F. and A.G.; project administration, B.F. and A.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The study was funded by the University of Lille (Lille, France).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: We are very grateful to Lars Enik and Frédéric Mercury for their helpful advice on heavy metals.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Breton, J.; Le Clère, K.; Daniel, C.; Sauty, M.; Nakab, L.; Chassat, T.; Dewulf, J.; Penet, S.; Carnoy, C.; Thomas, P.; et al. Chronic Ingestion of Cadmium and Lead Alters the Bioavailability of Essential and Heavy Metals, Gene Expression Pathways and Genotoxicity in Mouse Intestine. *Arch. Toxicol.* **2013**, *87*, 1787–1795. [\[CrossRef\]](#)
- Breton, J.; Daniel, C.; Dewulf, J.; Pothion, S.; Froux, N.; Sauty, M.; Thomas, P.; Pot, B.; Foligné, B. Gut Microbiota Limits Heavy Metals Burden Caused by Chronic Oral Exposure. *Toxicol. Lett.* **2013**, *222*, 132–138. [\[CrossRef\]](#)
- Flora, G.; Gupta, D.; Tiwari, A. Toxicity of Lead: A Review with Recent Updates. *Interdiscip. Toxicol.* **2012**, *5*, 47–58. [\[CrossRef\]](#)
- Wani, A.L.; Ara, A.; Usmani, J.A. Lead Toxicity: A Review. *Interdiscip. Toxicol.* **2015**, *8*, 55–64. [\[CrossRef\]](#)
- Lanphear, B.P.; Hornung, R.; Khoury, J.; Yolton, K.; Baghurst, P.; Bellinger, D.C.; Canfield, R.L.; Dietrich, K.N.; Bornschein, R.; Greene, T.; et al. Low-Level Environmental Lead Exposure and Children’s Intellectual Function: An International Pooled Analysis. *Environ. Health Perspect.* **2005**, *113*, 894–899. [\[CrossRef\]](#)
- Reuben, A. Childhood Lead Exposure and Adult Neurodegenerative Disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* **2018**, *64*, 17–42. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Watt, G.C.; Britton, A.; Gilmour, H.G.; Moore, M.R.; Murray, G.D.; Robertson, S.J. Public Health Implications of New Guidelines for Lead in Drinking Water: A Case Study in an Area with Historically High Water Lead Levels. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* **2000**, *38*, 73–79. [\[CrossRef\]](#)
- International Agency for Research on Cancer. Cadmium and Cadmium Compounds. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* **1993**, *58*, 119–237.
- Järup, L.; Akesson, A. Current Status of Cadmium as an Environmental Health Problem. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2009**, *238*, 201–208. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Rinaldi, M.; Micali, A.; Marini, H.; Adamo, E.B.; Puzzolo, D.; Pisani, A.; Trichilo, V.; Altavilla, D.; Squadrito, F.; Minutoli, L. Cadmium, Organ Toxicity and Therapeutic Approaches: A Review on Brain, Kidney and Testis Damage. *Curr. Med. Chem.* **2017**, *24*, 3879–3893. [\[CrossRef\]](#)
- Satarug, S.; Garrett, S.H.; Sens, M.A.; Sens, D.A. Cadmium, Environmental Exposure, and Health Outcomes. *Environ. Health Perspect.* **2010**, *118*, 182–190. [\[CrossRef\]](#)
- Buha, A.; Đukić-Čosić, D.; Čurčić, M.; Bulat, Z.; Antonijević, B.; Moulis, J.-M.; Goumenou, M.; Wallace, D. Emerging Links between Cadmium Exposure and Insulin Resistance: Human, Animal, and Cell Study Data. *Toxics* **2020**, *8*, 63. [\[CrossRef\]](#)
- Skalny, A.V.; Lima, T.R.R.; Ke, T.; Zhou, J.-C.; Bornhorst, J.; Alekseenko, S.I.; Aaseth, J.; Anesti, O.; Sarigiannis, D.A.; Tsatsakis, A.; et al. Toxic Metal Exposure as a Possible Risk Factor for COVID-19 and Other Respiratory Infectious Diseases. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* **2020**, *146*, 111809. [\[CrossRef\]](#)
- Satarug, S.; Gobe, G.C.; Vesey, D.A.; Phelps, K.R. Cadmium and Lead Exposure, Nephrotoxicity, and Mortality. *Toxics* **2020**, *8*. [\[CrossRef\]](#)
- Hossein-Khannazer, N.; Azizi, G.; Eslami, S.; Alhassan Mohammed, H.; Fayyaz, F.; Hosseinzadeh, R.; Usman, A.B.; Kamali, A.N.; Mohammadi, H.; Jadidi-Niaragh, F.; et al. The Effects of Cadmium Exposure in the Induction of Inflammation. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **2020**, *42*, 1–8. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Breton, J.; Daniel, C.; Vignal, C.; Body-Malapel, M.; Garat, A.; Plé, C.; Foligné, B. Does Oral Exposure to Cadmium and Lead Mediate Susceptibility to Colitis? The Dark-and-Bright Sides of Heavy Metals in Gut Ecology. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 19200. [\[CrossRef\]](#)
- Sanders, A.P.; Claus Henn, B.; Wright, R.O. Perinatal and Childhood Exposure to Cadmium, Manganese, and Metal Mixtures and Effects on Cognition and Behavior: A Review of Recent Literature. *Curr. Environ. Health Rep.* **2015**, *2*, 284–294. [\[CrossRef\]](#)
- Becaria, A.; Campbell, A.; Bondy, S.C. Aluminum as a Toxicant. *Toxicol. Ind. Health* **2002**, *18*, 309–320. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Igbokwe, I.O.; Igwenagu, E.; Igbokwe, N.A. Aluminium Toxicosis: A Review of Toxic Actions and Effects. *Interdiscip. Toxicol.* **2019**, *12*, 45–70. [\[CrossRef\]](#)
- Exley, C.; Clarkson, E. Aluminium in Human Brain Tissue from Donors without Neurodegenerative Disease: A Comparison with Alzheimer’s Disease, Multiple Sclerosis and Autism. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 7770. [\[CrossRef\]](#)
- Jeong, C.H.; Kwon, H.C.; Kim, D.H.; Cheng, W.N.; Kang, S.; Shin, D.-M.; Yune, J.H.; Yoon, J.E.; Chang, Y.H.; Sohn, H.; et al. Effects of Aluminum on the Integrity of the Intestinal Epithelium: An in Vitro and in Vivo Study. *Environ. Health Perspect.* **2020**, *128*, 17013. [\[CrossRef\]](#)
- Esquerre, N.; Basso, L.; Dubuquoy, C.; Djouina, M.; Chappard, D.; Blanpied, C.; Desreumaux, P.; Vergnolle, N.; Vignal, C.; Body-Malapel, M. Aluminum Ingestion Promotes Colorectal Hypersensitivity in Rodents. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **2019**, *7*, 185–196. [\[CrossRef\]](#)
- Lerner, A. Aluminum Is a Potential Environmental Factor for Crohn’s Disease Induction: Extended Hypothesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2007**, *1107*, 329–345. [\[CrossRef\]](#)
- Pineton de Chambrun, G.; Body-Malapel, M.; Frey-Wagner, I.; Djouina, M.; Deknuydt, F.; Atrott, K.; Esquerre, N.; Altare, F.; Neut, C.; Arrieta, M.C.; et al. Aluminum Enhances Inflammation and Decreases Mucosal Healing in Experimental Colitis in Mice. *Mucosal Immunol.* **2014**, *7*, 589–601. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Vignal, C.; Desreumaux, P.; Body-Malapel, M. Gut: An Underestimated Target Organ for Aluminum. *Morphol. Bull. Assoc. Anat.* **2016**, *100*, 75–84. [\[CrossRef\]](#)

26. Röllin, H.B.; Nogueira, C.; Olutola, B.; Channa, K.; Odland, J.Ø. Prenatal Exposure to Aluminum and Status of Selected Essential Trace Elements in Rural South African Women at Delivery. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* **2018**, *15*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Duan, H.; Yu, L.; Tian, F.; Zhai, Q.; Fan, L.; Chen, W. Gut Microbiota: A Target for Heavy Metal Toxicity and a Probiotic Protective Strategy. *Sci. Total Environ.* **2020**, *742*, 140429. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Assefa, S.; Köhler, G. Intestinal Microbiome and Metal Toxicity. *Curr. Opin. Toxicol.* **2020**, *19*, 21–27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Tsiaoussis, J.; Antoniou, M.N.; Koliarakis, I.; Mesnage, R.; Vardavas, C.I.; Izotov, B.N.; Psaroulaki, A.; Tsatsakis, A. Effects of Single and Combined Toxic Exposures on the Gut Microbiome: Current Knowledge and Future Directions. *Toxicol. Lett.* **2019**, *312*, 72–97. [[CrossRef](#)]
30. Bolan, S.; Seshadri, B.; Grainge, I.; Talley, N.J.; Naidu, R. Gut Microbes Modulate Bioaccessibility of Lead in Soil. *Chemosphere* **2020**, 128657. [[CrossRef](#)]
31. Nakamura, I.; Hosokawa, K.; Tamura, H.; Miura, T. Reduced Mercury Excretion with Feces in Germfree Mice after Oral Administration of Methyl Mercury Chloride. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1977**, *17*, 528–533. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Zhai, Q.; Qu, D.; Feng, S.; Yu, Y.; Yu, L.; Tian, F.; Zhao, J.; Zhang, H.; Chen, W. Oral Supplementation of Lead-Intolerant Intestinal Microbes Protects Against Lead (Pb) Toxicity in Mice. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 3161. [[CrossRef](#)]
33. Gupta, A.; Joia, J. Microbes as Potential Tool for Remediation of Heavy Metals: A Review. *J. Microb. Biochem. Technol.* **2016**, *8*. [[CrossRef](#)]
34. Monachese, M.; Burton, J.P.; Reid, G. Bioremediation and Tolerance of Humans to Heavy Metals through Microbial Processes: A Potential Role for Probiotics? *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 6397–6404. [[CrossRef](#)]
35. George, F.; Daniel, C.; Thomas, M.; Singer, E.; Guilbaud, A.; Tessier, F.J.; Revol-Junelles, A.-M.; Borges, F.; Foligné, B. Occurrence and Dynamism of Lactic Acid Bacteria in Distinct Ecological Niches: A Multifaceted Functional Health Perspective. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2899. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Ibrahim, F.; Halttunen, T.; Tahvonen, R.; Salminen, S. Probiotic Bacteria as Potential Detoxification Tools: Assessing Their Heavy Metal Binding Isotherms. *Can. J. Microbiol.* **2006**, *52*, 877–885. [[CrossRef](#)]
37. Halttunen, T.; Salminen, S.; Tahvonen, R. Rapid Removal of Lead and Cadmium from Water by Specific Lactic Acid Bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, *114*, 30–35. [[CrossRef](#)]
38. Teemu, H.; Seppo, S.; Jussi, M.; Raija, T.; Kalle, L. Reversible Surface Binding of Cadmium and Lead by Lactic Acid and Bifidobacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **2008**, *125*, 170–175. [[CrossRef](#)]
39. Bhakta, J.N.; Ohnishi, K.; Munekage, Y.; Iwasaki, K.; Wei, M.Q. Characterization of Lactic Acid Bacteria-Based Probiotics as Potential Heavy Metal Sorbents. *J. Appl. Microbiol.* **2012**, *112*, 1193–1206. [[CrossRef](#)]
40. Kinoshita, H.; Sohma, Y.; Ohtake, F.; Ishida, M.; Kawai, Y.; Kitazawa, H.; Saito, T.; Kimura, K. Biosorption of Heavy Metals by Lactic Acid Bacteria and Identification of Mercury Binding Protein. *Res. Microbiol.* **2013**, *164*, 701–709. [[CrossRef](#)]
41. Topcu, A.; Bulat, T. Removal of Cadmium and Lead from Aqueous Solution by *Enterococcus Faecium* Strains. *J. Food Sci.* **2010**, *75*, 13–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Halttunen, T.; Collado, M.C.; El-Nezami, H.; Meriluoto, J.; Salminen, S. Combining Strains of Lactic Acid Bacteria May Reduce Their Toxin and Heavy Metal Removal Efficiency from Aqueous Solution. *Lett. Appl. Microbiol.* **2008**, *46*, 160–165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Daisley, B.A.; Monachese, M.; Trinder, M.; Bisanz, J.E.; Chmiel, J.A.; Burton, J.P.; Reid, G. Immobilization of Cadmium and Lead by *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 Mitigates Apical-to-Basolateral Heavy Metal Translocation in a Caco-2 Model of the Intestinal Epithelium. *Gut Microbes* **2019**, *10*, 321–333. [[CrossRef](#)]
44. Tian, F.; Zhai, Q.; Zhao, J.; Liu, X.; Wang, G.; Zhang, H.; Chen, W. *Lactobacillus plantarum* CCFM8661 Alleviates Lead Toxicity in Mice. *Biol. Trace Elem. Res.* **2012**, *150*, 264–271. [[CrossRef](#)]
45. Li, B.; Jin, D.; Yu, S.; Etareri Evvie, S.; Muhammad, Z.; Huo, G.; Liu, F. In Vitro and In Vivo Evaluation of *Lactobacillus delbrueckii* Subsp. *bulgaricus* KLDS1.0207 for the Alleviative Effect on Lead Toxicity. *Nutrients* **2017**, *9*. [[CrossRef](#)]
46. Zhai, Q.; Wang, G.; Zhao, J.; Liu, X.; Narbad, A.; Chen, Y.Q.; Zhang, H.; Tian, F.; Chen, W. Protective Effects of *Lactobacillus plantarum* CCFM8610 against Chronic Cadmium Toxicity in Mice Indicate Routes of Protection besides Intestinal Sequestration. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80*, 4063–4071. [[CrossRef](#)]
47. Zhai, Q.; Wang, G.; Zhao, J.; Liu, X.; Tian, F.; Zhang, H.; Chen, W. Protective Effects of *Lactobacillus plantarum* CCFM8610 against Acute Cadmium Toxicity in Mice. *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, *79*, 1508–1515. [[CrossRef](#)]
48. Yu, L.; Zhai, Q.; Yin, R.; Li, P.; Tian, F.; Liu, X.; Zhao, J.; Gong, J.; Zhang, H.; Chen, W. *Lactobacillus plantarum* CCFM639 Alleviate Trace Element Imbalance-Related Oxidative Stress in Liver and Kidney of Chronic Aluminum Exposure Mice. *Biol. Trace Elem. Res.* **2017**, *176*, 342–349. [[CrossRef](#)]
49. Yu, L.; Zhai, Q.; Liu, X.; Wang, G.; Zhang, Q.; Zhao, J.; Narbad, A.; Zhang, H.; Tian, F.; Chen, W. *Lactobacillus plantarum* CCFM639 Alleviates Aluminium Toxicity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *100*, 1891–1900. [[CrossRef](#)]
50. Bron, P.A.; Tomita, S.; Mercenier, A.; Kleerebezem, M. Cell Surface-Associated Compounds of Probiotic Lactobacilli Sustain the Strain-Specificity Dogma. *Curr. Opin. Microbiol.* **2013**, *16*, 262–269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Kumar, N.; Kumari, V.; Ram, C.; Thakur, K.; Tomar, S.K. Bio-Prospectus of Cadmium Bioadsorption by Lactic Acid Bacteria to Mitigate Health and Environmental Impacts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *102*, 1599–1615. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

52. Sun, Z.; Harris, H.M.B.; McCann, A.; Guo, C.; Argimón, S.; Zhang, W.; Yang, X.; Jeffery, I.B.; Cooney, J.C.; Kagawa, T.F.; et al. Expanding the Biotechnology Potential of Lactobacilli through Comparative Genomics of 213 Strains and Associated Genera. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 8322. [[CrossRef](#)]
53. Deutsch, S.-M.; Mariadassou, M.; Nicolas, P.; Parayre, S.; Le Guellec, R.; Chuat, V.; Peton, V.; Le Maréchal, C.; Burati, J.; Loux, V.; et al. Identification of Proteins Involved in the Anti-Inflammatory Properties of *Propionibacterium freudenreichii* by Means of a Multi-Strain Study. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 46409. [[CrossRef](#)]
54. Ochman, H.; Selander, R.K. Standard Reference Strains of *Escherichia coli* from Natural Populations. *J. Bacteriol.* **1984**, *157*, 690–693. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Rahmouni, O.; Vignal, C.; Titécat, M.; Foligné, B.; Pariente, B.; Dubuquoy, L.; Desreumaux, P.; Neut, C. High Carriage of Adherent Invasive *E. coli* in Wildlife and Healthy Individuals. *Gut Pathog.* **2018**, *10*, 23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Pradel, E.; Zhang, Y.; Pujol, N.; Matsuyama, T.; Bargmann, C.I.; Ewbank, J.J. Detection and Avoidance of a Natural Product from the Pathogenic Bacterium *Serratia marcescens* by *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 2295–2300. [[CrossRef](#)]
57. Adouard, N.; Foligné, B.; Dewulf, J.; Bouix, M.; Picque, D.; Bonnarne, P. In Vitro Characterization of the Digestive Stress Response and Immunomodulatory Properties of Microorganisms Isolated from Smear-Ripened Cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **2015**, *197*, 98–107. [[CrossRef](#)]
58. Malik, A.C.; Reinbold, G.W.; Vedamuthu, E.R. An Evaluation of the Taxonomy of *Propionibacterium*. *Can. J. Microbiol.* **1968**, *14*, 1185–1191. [[CrossRef](#)]
59. Ameen, F.A.; Hamdan, A.M.; El-Naggar, M.Y. Assessment of the Heavy Metal Bioremediation Efficiency of the Novel Marine Lactic Acid Bacterium, *Lactobacillus plantarum* MF042018. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 314. [[CrossRef](#)]
60. Lin, D.; Ji, R.; Wang, D.; Xiao, M.; Zhao, J.; Zou, J.; Li, Y.; Qin, T.; Xing, B.; Chen, Y.; et al. The Research Progress in Mechanism and Influence of Biosorption between Lactic Acid Bacteria and Pb(II): A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2019**, *59*, 395–410. [[CrossRef](#)]
61. Muhammad, Z.; Ramzan, R.; Zhang, S.; Hu, H.; Hameed, A.; Bakry, A.M.; Dong, Y.; Wang, L.; Pan, S. Comparative Assessment of the Bioremedial Potentials of Potato Resistant Starch-Based Microencapsulated and Non-Encapsulated *Lactobacillus plantarum* to Alleviate the Effects of Chronic Lead Toxicity. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1306. [[CrossRef](#)]
62. Mohapatra, R.K.; Parhi, P.K.; Pandey, S.; Bindhani, B.K.; Thatoi, H.; Panda, C.R. Active and Passive Biosorption of Pb(II) Using Live and Dead Biomass of Marine Bacterium *Bacillus xiamenensis* PbRPSD202: Kinetics and Isotherm Studies. *J. Environ. Manag.* **2019**, *247*, 121–134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Kirillova, A.V.; Danilushkina, A.A.; Irisov, D.S.; Bruslik, N.L.; Fakhrullin, R.F.; Zakharov, Y.A.; Bukhmin, V.S.; Yarullina, D.R. Assessment of Resistance and Bioremediation Ability of *Lactobacillus* Strains to Lead and Cadmium. *Int. J. Microbiol.* **2017**, *2017*, 9869145. [[CrossRef](#)]
64. Lin, D.; Cao, H.; Zhong, Y.; Huang, Y.; Zou, J.; He, Q.; Ji, R.; Qin, T.; Chen, Y.; Wang, D.; et al. Screening and Identification of Lactic Acid Bacteria from Ya'an Pickle Water to Effectively Remove Pb²⁺. *AMB Express* **2019**, *9*, 10. [[CrossRef](#)]
65. Foligné, B.; Breton, J.; Mater, D.; Jan, G. Tracking the Microbiome Functionality: Focus on *Propionibacterium* Species. *Gut* **2013**, *62*, 1227–1228. [[CrossRef](#)]
66. Djurasevic, S.; Jama, A.; Jasnic, N.; Vujovic, P.; Jovanovic, M.; Mitic-Culafic, D.; Knezevic-Vukcevic, J.; Cacic-Milosevic, M.; Ilijevic, K.; Djordjevic, J. The Protective Effects of Probiotic Bacteria on Cadmium Toxicity in Rats. *J. Med. Food* **2017**, *20*, 189–196. [[CrossRef](#)]
67. Bisanz, J.E.; Enos, M.K.; Mwanga, J.R.; Chagalucha, J.; Burton, J.P.; Gloor, G.B.; Reid, G. Randomized Open-Label Pilot Study of the Influence of Probiotics and the Gut Microbiome on Toxic Metal Levels in Tanzanian Pregnant Women and School Children. *mBio* **2014**, *5*, e01580-14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Zhai, Q.; Wang, J.; Cen, S.; Zhao, J.; Zhang, H.; Tian, F.; Chen, W. Modulation of the Gut Microbiota by a Galactooligosaccharide Protects against Heavy Metal Lead Accumulation in Mice. *Food Funct.* **2019**, *10*, 3768–3781. [[CrossRef](#)]
69. Bhattacharya, S. The Role of Probiotics in the Amelioration of Cadmium Toxicity. *Biol. Trace Elem. Res.* **2020**, *197*, 440–444. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Notification ministérielle d'autorisation de projet utilisant des animaux à des fins scientifique – APAFIS (agrément du comité d'éthique)



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR,
DE LA RECHERCHE ET DE L'INNOVATION

Paris, le 8 décembre 2020

Objet : Notification de décision relative à l'autorisation de projet utilisant des animaux à des fins scientifiques

Direction générale de la
recherche et de l'innovation

Service de la performance,
du financement et de la
contractualisation avec les
organismes de recherche

Département des pratiques de
recherche réglementées

Cellule Animaux utilisés à des
Fins Scientifiques - AFIS -

Affaire suivie par
Véronique Delassault
Responsable administrative
de la cellule AFIS

Tél : 01 55 55 97 27
veronique.delassault
@recherche.gouv.fr

autorisation-projet
@recherche.gouv.fr

1 rue Descartes
75231 Paris Cedex 05

En application des dispositions du code rural et de la pêche maritime, notamment ses articles R.214-87 à R.214-126, le projet :

- référencé sous le numéro APAFIS#27146-2020082418105439 v4
- ayant pour titre : Etude de la dissémination de contaminants xénobiotiques (type métaux lourds) dans l'organisme et limitation par l'utilisation de microorganismes non pathogènes chez la souris
- déposé par l'établissement utilisateur : Plateforme de ressources expérimentales, campus hospitalo-universitaire, Université de Lille - Droit et Santé, numéro d'agrément D5935010, dont le responsable est Monsieur Jean-Christophe CAMART,
- et dont la responsabilité de la mise en œuvre générale du projet et de sa conformité à l'autorisation est assurée par : Monsieur Benoit FOLIGNE, Madame Fanny VILAIN-GEORGE, Madame Annie STANDAERT,

est autorisé.

L'autorisation de projet est accordée, sous réserve de la validité de l'agrément de l'établissement utilisateur, pour une durée de 5 ans à compter de la présente notification.

Le projet précité a été évalué sur le plan éthique par le comité d'éthique en expérimentation animale n°075 et a reçu un avis favorable.

Ce projet n'est pas soumis à l'obligation d'une appréciation rétrospective à l'issue de sa réalisation.

Pour la ministre et par délégation
le chef du service de la performance,
du financement et de la contractualisation
avec les organismes de recherche

Vincent MOTYKA

Monsieur Jean-Christophe CAMART
Plateforme de ressources expérimentales, campus hospitalo-universitaire,
Université de Lille - Droit et Santé

Résumé

Les éléments traces métalliques (ETM) comme le plomb, le cadmium, et dans une moindre mesure l'aluminium, sont toxiques et représentent un problème majeur de santé publique. Ils peuvent être dangereux pour la santé quelle que soit leur porte d'entrée dans l'organisme (*i.e.* ingestion *via* l'alimentation ou l'eau de boisson, inhalation). De nombreuses bactéries sont capables d'interagir avec ces ETM, pour en réduire la biodisponibilité. Les bactéries d'origine intestinale et/ou alimentaires sont des candidates particulièrement intéressantes pour la bioremédiation *in vivo*, étant pour la plupart inoffensives pour l'humain. Dans ce travail de thèse, nous avons évalué les capacités de fixation de 225 souches bactériennes vis-à-vis du Pb(II), Cd(II), et Al(III), les dosages d'ETM ayant été réalisés par ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometer*). Des comparaisons intra- et inter-espèces ont été réalisés au sein du *phylum* des Firmicutes (principalement des bactéries lactiques, dont des *Lactobacillus*, quelques *Lactococcus*, *Pediococcus* et *Carnobacterium*), des Actinobacteria et des Proteobacteria. Des expériences de chélation sur des mélanges de plomb et de cadmium ont également été réalisées. Des bons candidats ont ainsi d'abord été identifiés *in vitro*, puis évalués *in vivo* chez la souris. Au cours de ce travail, un effet potentialisateur du pouvoir chélateur du Tween 80, étendu à d'autres détergents, a été mis en évidence chez les bactéries alimentaires du genre *Propionibacterium* pour la chélation du plomb. Des expérimentations complémentaires visant à mieux comprendre les mécanismes impliqués dans ce cas particulier ont été réalisées, dont des variations des conditions de chélation ainsi que des approches par microscopie électronique et à force atomique.

Mots-clés : bioremédiation, microbiote, bactéries lactiques, Entérobactérales, plomb, cadmium, aluminium, probiotiques, ICP-MS

Abstract

Toxic metals such as lead, cadmium, and to a lesser extent, aluminium are detrimental to health and represents a major public problem. They are health threatening whenever they are ingested by aliments or water or inhaled). Some bacteria are able to reduce the bioavailability of toxic metals by interacting with them. Intestinal and alimentary bacteria represent promising candidates for *in vivo* bioremediation approaches, some of these bacteria already have the “generally recognized status” status. During this thesis, we used inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) to investigate the ability of 225 bacteria strains to remove Pb(II), Cd(II), and Al(III). Intra- and interspecies comparisons were performed among the Firmicutes (mostly lactic acid bacteria, including *Lactobacillus*, some *Lactococcus*, *Pediococcus* and *Carnobacterium*), Actinobacteria, and Proteobacteria. The capacity to remove of a mixture of lead and cadmium was also investigated. Best candidates were first identified *in vitro*, and were challenged *in vivo* in a mouse model of heavy-metal exposition. A strong boosting effect of Tween 80 on the removal of lead by *Propionibacterium* was observed and further extended to other detergents. In line, we investigated this observation to better understand and visualize the underlying mechanisms, using variations in the chelation conditions and distinct microscopy approaches.

Keywords : bioremediation, microbiota, lactic acid bacteria, Enterobacterales, lead, cadmium, aluminium, probiotics, ICP-MS