

Caractérisation in vivo des propriétés antimicrobiennes de la souche probiotique Lcr35®

Cyril Poupet

▶ **To cite this version:**

Cyril Poupet. Caractérisation in vivo des propriétés antimicrobiennes de la souche probiotique Lcr35®. Santé. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2020. Français. ⟨NNT : 2020CLFAC008⟩. ⟨tel-02928987⟩

HAL Id: tel-02928987

https://theses.hal.science/tel-02928987v1

Submitted on 3 Sep 2020

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

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



HAL Authorization

Université Clermont Auvergne

École doctorale des Sciences de la Vie, Santé, Agronomie, Environnement

Institut Universitaire de Technologie de Clermont-Ferrand
Campus Universitaire Simone Veil

Unité Mixte de Recherche sur le Fromage 0545

Caractérisation *in vivo* des propriétés antimicrobiennes de la souche probiotique Lcr35®

Utilisation du modèle *Caenorhabditis elegans* pour l'étude des interactions hôte - microorganismes

Cyril POUPET

Doctorat Biologie - Santé

Directrice de thèse : Professeure Stéphanie Bornes, UCA
Co-encadrant de thèse : Docteur Adrien Nivoliez, biose® Industrie

Soutenue publiquement le 25 juin 2020

Membres du jury

Pr. Christiane Forestier, UMR 6023 LMGE, Université Clermont Auvergne	Présidente du jury
Dr. Philippe Langella, DR INRAE, UMR MICALIS, Jouy-en-Josas	Rapporteur
Pr. Tom Van de Wiele, Ghent University, CMET, Gand, Belgique	Rapporteur
Pr. Benoit Foligné, LIRIC, UMR 995, Université de Lille	Examinateur
Dr. Claudia Thoral, Responsable stratégique R&D, biose®, Clermont-Ferrand	Examinatrice
Pr. Stéphanie Bornes, UMRF 0545, Université Clermont Auvergne, Aurillac	Directrice de thèse
Dr. Adrien Nivoliez, Président Directeur Général biose® Industrie, Aurillac	Invité

Résumé

Les antibiotiques et antifongiques constituent une des plus grandes découvertes de la médecine et ont participé à sauver des millions de vies. Cependant, leur efficacité est menacée du fait de l'adaptation des microorganismes qui deviennent résistants à leurs actions. Ce phénomène est en particulier lié à la consommation anormalement élevée de molécules antimicrobiennes, notamment en France. En dépit du fait que ces résistances soient acquises majoritairement par des bactéries, les levures pathogènes comme le genre *Candida* n'échappent pas à la règle. Dès lors, la communauté scientifique et les services de santé doivent mettre en place au plus vite des alternatives aux médicaments traditionnels. Parmi ces alternatives, l'utilisation de microorganismes probiotiques dont le potentiel antifongique a déjà été démontré à l'aide de modèles précliniques (cultures cellulaires, animaux de laboratoire) et d'études cliniques est prometteuse. Ceci est notamment le cas du *Live Biotherapeutic Microorganism Lactobacillus rhamnosus* Lcr35® dont l'activité anti-*C. albicans* a été prouvée lors de travaux précédents sans toutefois parvenir à décrire les mécanismes d'actions. Les comprendre est devenu un besoin stratégique pour le développement de nouveaux traitements pour l'homme.

Une approche expérimentale innovante, utilisant le modèle nématode *Caenorhabditis elegans*, a été mise en œuvre. Celle-ci visait à simuler une infection fongique et à évaluer l'effet de Lcr35® par des approches préventive et curative. Les impacts ont été suivis au moyen de tests de longévité et de survie de l'hôte ainsi que par l'étude de son transcriptome (de manière ciblée et globale), le tout en lien avec le niveau d'activité d'un facteur de transcription central, DAF-16. Nous avons ainsi démontré que Lcr35® induisait une survie significativement augmentée de l'hôte y compris après infection par *Candida*. L'analyse du transcriptome de *C. elegans* et l'utilisation de souches mutantes ont montré l'implication des voies de signalisations p38 MAPK et DAF-2/DAF-16 impliquées dans la longévité et la lutte anti-pathogène. De plus, des tests *in vitro* sur cellules intestinales Caco-2 ont montré une inhibition significative de la croissance et de l'adhésion du pathogène par Lcr35®. Ces résultats suggèrent que la bactérie Lcr35® a une action directe sur le pathogène en entraînant sa mort, mais également en modulant la réponse transcriptionnelle de l'hôte via des voies de signalisation hautement conservées. Une étude plus approfondie ciblant notamment le métabolome de l'hôte permettrait une compréhension plus fine des mécanismes afin d'adapter le criblage et la conception industrielle de LBM selon la cible thérapeutique.

Mots clés : *C. elegans*, Lcr35®, *C. albicans*, infection, mécanismes moléculaires

Abstract

Antibiotics and antifungals are one of the greatest discoveries of medicine and have helped save millions of lives. However, their effectiveness is threatened by the adaptation of microorganisms that become resistant. This phenomenon is particularly related to the abnormally high consumption of antimicrobial molecules, especially in France. Even though these resistances are mainly acquired by bacteria, pathogenic yeasts such as the genus *Candida* do not escape the rule. Therefore, the scientific community and health services must implement as soon as possible alternatives to traditional drugs. Among these alternatives, the use of probiotic microorganisms whose antifungal potential has already been demonstrated using preclinical models (cell cultures, laboratory animals) and clinical studies is particularly promising. This is the case of the Live Biotherapeutic Microorganism *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35® strain whose anti-*C. albicans* has been demonstrated in previous work but failed to describe the mechanisms of action. Understanding them has become a strategic need for the development of new treatments for humans.

An innovative experimental approach, using the nematode model *Caenorhabditis elegans*, has been implemented. The aim was to simulate a fungal infection and treat it with Lcr35® using preventive and curative approaches. These were followed by means of tests of longevity and survival of the host, by the study of its transcriptome (in a targeted and global way), all in connection with the follow-up of the activity of a factor transcription, DAF-16. We thus demonstrated that Lcr35® induced a significantly increased survival of the host, including after infection by *Candida*. The analysis of the transcriptome of *C. elegans* and the use of mutant strains showed the involvement of the p38 MAPK and DAF-2 / DAF-16 signaling pathways, pathways involved in longevity and pathogen control. Also, *in vitro* Caco-2 intestinal cell assays showed significant inhibition of pathogen growth and adhesion by Lcr35®. These results suggest that the bacterium Lcr35® has a direct action on the pathogen causing its death but also by modulating the transcriptional response of the host via highly conserved signaling pathways. Further study, targeting the host metabolome, would allow a better understanding of the mechanisms and adapt the industrial design of LBM according to the therapeutic target.

Keywords: *C. elegans*, Lcr35®, *C. albicans*, infection, molecular mechanisms

Financements

Cette thèse, intitulée « Caractérisation *in vivo* des propriétés antimicrobiennes de la souche probiotique Lcr35® » est cofinancée par l'Union européenne dans le cadre du Fonds Européen de Développement Régional (FEDER).

Ce travail de recherche bénéficie également d'un financement par le biais d'une bourse innovation du Conseil Régional Auvergne–Rhône-Alpes de même que par l'entreprise pharmaceutique biose® (Aurillac, France).

Ce projet est soutenu par le cluster d'entreprise Institut de Recherche Pharmabiotique (IRP).

Remerciements

J'adresse tout naturellement mes premiers remerciements à ma directrice de thèse Stéphanie Bornes pour avoir encadré mon travail pendant ces trois années. Tu as su m'accompagner pendant cette aventure scientifique à travers tes précieux conseils et ta très grande gentillesse. Une thèse n'est pas un long fleuve tranquille, bien au contraire, mais tu as toujours été présente et grâce à toi, j'ai pu aller de l'avant. Ton soutien incontestable m'a permis de prendre confiance en moi et de réaliser beaucoup plus de choses que je ne l'aurais imaginé, et ce, avec une grande liberté d'action. Tu es vraiment une excellente directrice de thèse. J'ai été plus qu'honoré de travailler pour toi. Merci mille fois.

Je remercie vivement mon co-encadrant, Adrien Nivoliez, qui m'a donné l'opportunité d'être recruté sur cette thèse et qui par l'occasion m'a offert la possibilité de réaliser un de mes rêves : être titulaire d'un doctorat. Vous m'avez accordé votre confiance et pour cela, je ne peux que vous en être reconnaissant.

Mes travaux de recherche n'auraient pas été possibles sans le soutien de l'Union européenne dans le cadre du Fonds Européen de Développement Régional, de la région Auvergne-Rhône-Alpes et bien sûr de la société biose®, qui m'ont permis grâce à leurs aides financières, de me consacrer sereinement à l'élaboration de ma thèse.

Évidemment, une thèse ne se réalise pas seule et j'ai pu compter sur des collègues formidables Muriel Bonnet et Philippe Veisseire. Au même titre que Stéphanie, vous m'avez chaleureusement accueilli parmi vous, il y a maintenant trois ans. Vous avez su me guider, me conseiller, m'aider et me soutenir dans ma tâche de doctorant. Je sais que je peux compter sur vous. J'ai passé d'excellents moments avec vous, à rire de tout et de rien. Vous avez réussi à me convertir à l'univers Game of Thrones (je crois bien que la décoration de mon bureau s'en ressent) et j'apprécie beaucoup aller à la salle de sport avec toi, Philippe !

Bien sûr, je ne pouvais pas oublier notre chère Taous Saraoui, notre extraterrestre au grand cœur. Nous nous sommes côtoyés pendant 1 an et demi en tant que collègues. Je ne sais même plus combien de temps nous avons passé dans le labo ni même le nombre de week-ends où nous nous sommes vus au labo, mais en tout cas, cela a toujours été un réel plaisir de travailler avec toi. Tu m'as donné un nombre incalculable de conseils et tu m'as permis de beaucoup progresser. Et puis nous avons surtout beaucoup ri de nos bêtises respectives. Jamais je n'arriverai à te remercier pour tout ce que tu as fait. Tu es une véritable amie. J'ai une confiance absolue en toi.

Un très grand merci à Christophe Chassard, directeur de l'Unité Mixte de Recherche sur le Fromage pour sa sympathie, tout le temps qu'il m'a accordé et bien entendu, tous les précieux conseils qui ont été plus qu'utiles.

J'adresse mes remerciements à Guillaume Cardin, doctorant en biotechnologie / chimie, qui a littéralement partagé mon bureau pendant quelques mois. Tu m'as bien fait rire pendant tout ce temps, surtout quand on a refait la décoration des bureaux des stagiaires, mais aussi du tien ! J'ai bien ri aussi quand tu as fait tes premiers pas en microbiologie (la bouteille ouverte en dehors de la hotte). J'imagine qu'en chimie je ne serais pas meilleur !

Je tiens également à remercier Marylise Gachinat et Olivier Camarès pour leurs conseils et leurs aides au laboratoire. Aussi, j'ai une pensée toute particulière pour Maryse Combelles, Isabelle Péligry, nos formidables secrétaires, Pierre Delpech, Reshtrie Sheombarsing, Serge Marmitte et Stéphane Suc pour leur grande gentillesse et surtout pour les bons moments passés autour d'un café et d'un morceau de gâteau à la pause de 10 h. Bien sûr, je n'oublie pas l'ensemble du personnel de l'IUT Bio 15 que j'ai côtoyé au quotidien, l'ensemble du personnel de l'UMRF et bien sûr mes collègues de biose® et biose® Industries, notamment Caroline Dausset, Claudia Thoral, Claire Derlot, Amandine Pralus, Gaëlle Castel et Guillaume Bac.

Je suis également reconnaissant envers Christiane Forestier et Christophe d'Enfert qui, au travers de leurs conseils et avis lors des deux comités de suivi de thèse, m'ont permis d'orienter mes recherches plus efficacement et de pouvoir achever ce travail en temps et en heure.

Je tiens tout particulièrement à remercier Sabrina Amara, doctorante de l'Université de Saïda (Algérie) pour sa très bonne humeur, les nombreux fous-rires, souvent incontrôlables, qu'on a eus pendant les manipulations et la motivation qu'elle m'a donnée, même lorsque toutes les Caco ont été contaminées. Je remercie également tous les stagiaires que j'ai eu l'occasion d'encadrer, Muriel Théret, Jonathan Heuzé, Jeanne Riom et Noellie Veillon, pour leurs travaux, leur bonne humeur et surtout l'aide apportée dans ma tâche de thésard.

Enfin, je remercie du fond du cœur mes parents Fabienne et Jean-Michel ainsi que ma tante Nathalie et mon oncle Jean-Michel pour leur soutien accordé tout au long de cette aventure. Vous m'avez donné la force, le courage, la conviction nécessaires pour affronter l'immense tâche que représente une thèse, aussi bien d'un point de vue professionnel que personnel. Sans vous, je n'aurais jamais pu mener à terme ce projet et ainsi réaliser un de mes rêves.

Merci à tous !

Communications

Articles originaux et revue :

Poupet C, Saraoui T, Veisseire P, Bonnet M, Dausset C, Gachinat M, *et al*. *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35 as an effective treatment for preventing *Candida albicans* infection in the invertebrate model *Caenorhabditis elegans*: First mechanistic insights. PLoS One. 2019 Nov 6;14(11):e0216184. Available from: https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0216184

Poupet C, Veisseire P, Bonnet M, Camares C, Gachinat M, Dausset C, *et al*. Curative treatment of candidiasis by the live microorganism *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35® in the invertebrate model *Caenorhabditis elegans*: first mechanistic insights. Microorganisms. 2019, 8(1):34. Available from: https://www.mdpi.com/2076-2607/8/1/34

Veisseire P, Bonnet M, Saraoui T, Poupet C, Camarès O, Gachinat M, *et al*. Investigation into *in vitro* and *in vivo Caenorhabditis elegans* models to select cheese yeasts as probiotic candidates for their preventive effects against *Salmonella* Typhimurium. Microorganisms. 2020, 8(6):922. Available from: https://www.mdpi.com/2076-2607/8/6/922

Poupet C, Chassard C, Nivoliez A, Bornes S. *Caenorhabditis elegans*, a host to reveal and investigate the probiotic properties of beneficial microorganisms. Frontiers in Nutrition. En révision

Poupet C, Rifa E, Theil S, Bonnet M, Veisseire P, Cardin G, et al. The p38 MAP kinase pathway and the DAF-16 transcription factor are required for prolongevity and anti-candidiasis of *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35® in *Caenorhabditis elegans*. En préparation.

Poupet C, Rifa E, Theil S, Bonnet M, Veisseire P, Guéret S, et al. *C. elegans* transcriptomic profiles comparison between candidiasis preventive and curative treatments by the Live Biotherapeutic Microorganism Lcr35®. En préparation.

Communications orales :

15ème congrès national de la SFM, Paris, 30 septembre — 2 octobre 2019

Cyril Poupet, Taous Saraoui, Philippe Veisseire, Muriel Bonnet, Marylise Gachinat, Olivier Camarès, Adrien Nivoliez and Stéphanie Bornes. Lactobacillus rhamnosus *Lcr35® as an effective treatment for preventing* Candida albicans *infection in the preclinical model* Caenorhabditis elegans

Journées de l'École Doctorale SVSAE, Clermont-Ferrand, 23 – 24 mai 2019

Cyril Poupet, Taous Saraoui, Philippe Veisseire, Muriel Bonnet, Marylise Gachinat, Olivier Camarès, Adrien Nivoliez and Stéphanie Bornes. *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35® en tant que traitement efficace contre l'infection à *Candida albicans* dans le modèle préclinique *Caenorhabditis elegans*

VerMidi XXII, Sorbonne Université, Paris, 15 mars 2019

Cyril Poupet, Taous Saraoui, Philippe Veisseire, Muriel Bonnet, Marylise Gachinat, Olivier Camarès, Adrien Nivoliez and Stéphanie Bornes. Lactobacillus rhamnosus *Lcr35® as an effective treatment for preventing* Candida albicans *infection in the preclinical model* Caenorhabditis elegans

Ma Thèse en 180 secondes 2019, finale régionale, Clermont-Ferrand, 7 mars 2019

Probiotiques et mycoses : quand les bactéries partent à la chasse aux champignons

15ème rencontre des microbiologistes du pôle clermontois, Clermont-Ferrand, 26 avril 2018

Cyril Poupet, Adrien Nivoliez, Philippe Veisseire, Olivier Camarès, Christophe Chassard et Stéphanie Bornes. *Caractérisation* in vivo *du probiotique* Lactobacillus rhamnosus *Lcr35®*.

Communications affichées :

- **Congrès**

VerMidi XXIII, Sorbonne Université, Paris, 13 mars 2019

Poupet C., Veisseire P., Bonnet M., Camarès O., Gachinat M., Dausset C., Chassard C., Nivoliez A. and Bornes S. *Curative treatment of candidiasis by the live biotherapeutic microorganism* Lactobacillus rhamnosus *Lcr35® in the invertebrate model* Caenorhabditis elegans*: first mechanistic insights.*

.

VerMidi XXIII, Sorbonne Université, Paris, 13 mars 2019

Cardin G., Chalard P., Poupet C., Priam J., Bonnet M., Veisseire P., Ripoche I., Bornes S. and Rios L. *Cheese as a new source of bioactive metabolites for veterinary applications: development and validation of a proof of concept methodology*

Journées de l'Ecole Doctorale SVSAE, Clermont-Ferrand, 23 – 24 mai 2019

Cardin G., Chalard P., Poupet C., Bonnet M, Veisseire P, Ripoche I, Bornes S. et Rios L. Étude des propriétés biologiques de fractions de fromage à l'aide d'un modèle *in vivo* innovant.

VerMidi XXII, Sorbonne Université, Paris, 15 mars 2019

Cardin G., Chalard P., Bonnet M., Poupet C., Veisseire P., Ripoche I., Bornes S. and Rios L. In vivo *study of biological properties of cheese fractions.*

Stress, Pathogenesis, Aging, Metabolism and Small RNAs in *C. elegans*, University of Wisconsin, Madison (USA), 28 juin — 1er juillet 2018

Poupet C, Nivoliez A, Camarès O and Bornes S. In vivo *study of probiotic and anti*-Candida albicans *properties of* Lactobacillus rhamnosus *Lcr35®*.

Journées de l'Ecole Doctorale SVSAE, Clermont-Ferrand, 14 – 15 juin 2018

Poupet C, Nivoliez A, Camarès O and Bornes S. In vivo *study of probiotic and anti*-Candida albicans *properties of* Lactobacillus rhamnosus *Lcr35®*.

VerMidi XXI, CIML, Marseille, 26 janvier 2018

Poupet C., Dausset C., Chassard C., Nivoliez A., Bornes S., *Highlighting of the molecular mechanisms involved in probiotic properties of* Lactobacillus rhamnosus *Lcr35® in the host* Caenorhabditis elegans*.*

- **Visites institutionnelles et vulgarisation scientifique**

Signature de la convention de l'UMRF (3 tutelles), Aurillac, 3 décembre 2019

Poupet C, Nivoliez A, Camarès O and Bornes S. In vivo *study of probiotic and anti-*Candida albicans *properties of* Lactobacillus rhamnosus *Lcr35®*.

Cardin G, Chalard P, Poupet C, Priam J, Bonnet M, Veisseire P, Ripoche I, Bornes S et Rios L. *Le fromage comme nouvelle source de métabolites bioactifs à usage vétérinaire : développement et validation d'une méthodologie preuve de concept.*

Fête de la Science 2019, Aurillac, 10 octobre 2018

Cyril Poupet et Stéphanie Bornes. *Probiotiques et mycoses : quand les bactéries partent à la chasse aux champignons*

Fête de la Science 2018, Aurillac, 11 octobre 2018

Cyril Poupet, Taous Saraoui, Stéphanie Bornes et Adrien Nivoliez. *Étude du microbiote intestinal humain par des approches* in vitro *et* in vivo.

Coup de projecteur sur l'Unité Mixte de Recherche sur le Fromage, Aurillac, 28 mars 2018

Cyril Poupet, Adrien Nivoliez, Christophe Chassard et Stéphanie Bornes. Caenorhabditis elegans *: un modèle d'étude des interactions hôte-microorganismes*.

Visite de Philippe Mauguin, PDG de l'INRA, à l'UMRF, Aurillac, 26 octobre 2017

Cyril Poupet, Adrien Nivoliez, Christophe Chassard et Stéphanie Bornes. Caenorhabditis elegans*, un modèle expérimental en écologie microbienne*.

Fête de la Science 2017, Aurillac, 12 – 14 octobre 2017

Cyril Poupet, Taous Saraoui, Stéphanie Bornes et Adrien Nivoliez. *Étude du microbiote intestinal humain par des approches* in vitro *et* in vivo.

Notations et abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ALS	*Agglutinine-like sequence*
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
AMP	*Antimicrobial Peptide*
APF	Facteur Promoteur de l'Agrégation
API	*Active Pharmaceutical Ingredient*
ARN	Acide Ribonucléique
ARNr	ARN ribosomique
ARNm	ARN messager
ATCC	*American Type Culture Collection*
ATP	Adénosine Tri Phosphate
BDNF	*Brain-Derived Neurotrophic Factor*
BHI	*Brain Heart Infusion*
BV	*Bacterial Vaginosis*
CD4	Lymphocyte T CD4+
CGC	*Caenorhabditis Genetic Center*
CRF	Facteur de liberation de corticotropine
CSF	*Competence Sporulation Stimulating Factor*
CST	Community State Type
CVV	Candidose Vulvovaginale
CVVR	CVV récidivante
DAF	*abnormal DAuer Formation*
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DMEM	*Dulbecco's modified eagle's medium*
dNTP	Désoxyribonucléotide triphosphate
DT2	Diabète de Type II
EHEC	*Enterohemorragic E. coli*
EPS	Exopolysaccharide
ETEC	*Enterotoxinogenic E. coli*
FAO	*Food and Agriculture Organization of the United Nations*
FUdR	Fluoro desoxyuridine
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
FOXO	*Forkhead Box O*
GFP	*Green Fluorescent Protein*
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GRAS	*Generally Recognized As Safe*
H_2O_2	Peroxyde d'hydrogène
HMP	*Human Microbiome Project*
HSP	*Heat-Shock Protein*
IBS	*Irritable Bowel Syndrome*
IL	Interleukine
ILS	*Insulin-like signaling*
INRA	Institut National de Recherche Agronomique
LAB	*Lactic acid producing bacteria*
LB	*Lysogeny Broth*
LBM	*Live Biotherapeutic Microorganism*
LBP	*Live Biotherapeutic Product*
Lcr35®	*Lactobacillus rhamnosus* 35
MAPK	*Mitogen Activated Protein Kinase*
MICI	Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
mL	millilitre
MRS	De Man, Rogosa & Sharpe
mtROS	ROS mitochondrial
NGM	*Nematode Growth Medium*
NGMY	*NGM supplemented with Yeast Extract*
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PBS	*Phosphate Buffered Saline*
PCD	Mort cellulaire programmée
PCR	*polymerase chain reaction*
qPCR	*quantitative PCR*
RNAi	*RNA interference*
ROS	*Reactive Oxigene Species*
rpm	Rotation(s) par minute
RT	Réverse Transcription
SIDA	Syndrome de l'Immunodéficience Acquise
spp.	*species plurimae* (plusieurs espèces)
STS	Thiosulfate de sodium
TNF	Facteur de Nécrose Tumorale
UFC	Unité Formant Colonie
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
YPG	*Yeast extract Peptone Glucose*

Noms des organismes

A. muciniphila	*Akkermansia muciniphila*
B. licheniformis	*Bacillus licheniformis*
B. megaterium	*Bacillus megaterium*
B. subtilis	*Bacillus subtilis*
B. thuringiensis	*Bacillus thuringiensis*
B. caccae	*Bacteroides caccae*
B. fragilis	*Bacteroides fragilis*
B. ovatus	*Bacteroides ovatus*
B. thetaiotaomicron	*Bacteroides thetaiotaomicron*
B. infantis	*Bifidobacterium infantis*
B. longum	*Bifidobacterium longum*
B. pullicaecorum	*Butyricoccus pullicaecorum*
C. elegans	*Caenorhabditis elegans*
C. albicans	*Candida albicans*
C. glabrata	*Candida glabrata*
C. parapsilosis	*Candida parapsilosis*
C. tropicalis	*Candida tropicalis*
C. neoformans	*Cryptococcus neoformans*
D. rerio	*Danio rerio*
D. coniospora	*Drechmeria coniospora*
D. melanogaster	*Drosophila melanogaster*
E. faecalis	*Enterococcus faecalis*
E. coli	*Escherichia coli*
G. mellonella	*Galleria mellonella*
G. vaginalis	*Gardnerella vaginalis*
L. acidophilus	*Lactobacillus acidophilus*
L. brevis	*Lactobacillus brevis*
L. casei	*Lactobacillus casei*
L. crispatus	*Lactobacillus crispatus*
L. gasseri	*Lactobacillus gasseri*
L. helveticus	*Lactobacillus helveticus*
L. iners	*Lactobacillus iners*
L. jensenii	*Lactobacillus jensenii*
L. paracasei	*Lactobacillus paracasei*
L. plantarum	*Lactobacilus plantarum*
L. reuteri	*Lactobacillus reuteri*
L. rhamnosus	*Lactobacillus rhamnosus*
L. salivarius	*Lactobacillus salivarius*
L. zeae	*Lactobacillus zeae*
L. pneumophila	*Legionella pneumophila*
M. elsdenii	*Megasphaera elsdenii*
P. aeruginosa	*Pseudomonas aeruginosa*
S. boulardii	*Saccharomyces boulardii*
S. cerevisiae	*Saccharomyces cerevisiae*
S. Enteritidis	*Salmonella* Enteritidis
S. Typhimurium	*Salmonella* Typhimurium
S. marcescens	*Serratia marcescens*
S. aureus	*Staphylococcus aureus*
S. agalactiae	*Streptococcus agalactiae*

À mes parents, Fabienne et Jean-Michel.

À ma marraine et mon parrain, Nathalie et Jean-Michel.

Table des matières

RESUME **3**

ABSTRACT **5**

FINANCEMENTS **7**

REMERCIEMENTS **9**

COMMUNICATIONS **11**

NOTATIONS ET ABREVIATIONS **14**

TABLE DES MATIERES **19**

TABLE DES FIGURES **23**

LISTE DES TABLEAUX **24**

INTRODUCTION GENERALE **25**

PREMIERE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE **29**

CHAPITRE 1. LE MICROBIOTE HUMAIN, UN ECOSYSTEME EN EQUILIBRE 31

1. Introduction *31*

1. Le microbiote gastro-intestinal *32*

1.1. Composition et structure 32

1.2. Évolution temporelle du microbiote intestinal 36

1.3. L'axe microbiote – intestin – cerveau 38

2. Le microbiote vaginal *40*

2.1. Description générale 40

2.2. La dysbiose vaginale 41

2.3. Mécanismes antipathogènes des *Lactobacillus* 42

2.3.1. Inhibition de la croissance des souches pathogènes 42

2.3.2. Inhibition de l'adhésion et de l'expansion 44

3. Candida albicans, une levure pathogène opportuniste des tractus digestif et vaginal *45*

3.1. Généralités 45

3.2. Infections fongiques à *Candida albicans* 46

3.2.1. Candidoses digestives 46

3.2.1. Candidoses vulvovaginales 46

3.2.2. Candidoses systémiques 47

3.3. Mécanismes de pathogénicité 48
4. Conclusion 50
CHAPITRE 2. LES MICROORGANISMES PROBIOTIQUES 53
1. Introduction 53
2. Généralités sur les probiotiques 54
2.1. Historique 54
2.2. Les principales espèces probiotiques 55
2.2.1. Les levures 55
2.2.2. Les bactéries 55
2.2.2.1. Le genre *Lactobacillus* 56
2.2.2.2. Le genre *Bifidobacterium* 58
3. Sélection de souches et caractérisation in vitro de leurs propriétés probiotiques 58
4. Rôles des probiotiques dans l'équilibre des microbiotes 63
4.1. Rôles dans le tractus gastro-intestinal 63
4.2. Rôles des probiotiques dans le maintien de l'équilibre de la flore vaginale 65
4.3. Applications thérapeutiques de Lcr35® 66
4.3.1. Applications intestinales 66
4.3.2. Applications vaginales 67
5. Conclusion 69
CHAPITRE 3. CARACTERISATION DES MECANISMES D'ACTION DE MICROORGANISMES D'INTERET PAR DES APPROCHES IN *VIVO* 71
1. Introduction 71
2. Comparaison des modèles in vivo 73
2.1. Les modèles vertébrés 73
2.1.1. La souris *Mus musculus* 73
2.1.2. Le rat *Rattus norvegicus* 74
2.1.3. Le poisson-zèbre *Danio rerio* 76
2.1.4. Éthique et législation 77
2.2. Les modèles invertébrés 77
2.2.1. La mouche *Drosophila melanogaster* 77
2.2.2. La fausse teigne *Galleria mellonella* 78
2.2.3. Le nématode *Caenorhabditis elegans* 79
CHAPITRE 4. FOCUS SUR *CAENORHABDITIS ELEGANS* 81
1. Historique et généralités 81
2. Anatomie du nématode 85
2.1. Présentation générale 85
2.2. Le système digestif 87
2.3. Le système nerveux 88
3. Le cycle de vie du nématode 88
3.1. Reproduction et androdiécie 88

3.2. Le développement embryonnaire 89

4. C. elegans, un modèle pour l'étude des relations hôte – microorganismes probiotiques et pathogènes 91

4.1. Les microorganismes probiotiques influencent la durée de vie du nématode 92

4.1.1. Effets positifs et négatifs des probiotiques sur l'espérance de vie du ver... 92

4.1.2. Mécanismes et voies de signalisation impliqués 96

4.2. L'immunité chez *C. elegans* : une réponse adaptée aux stress biotiques et abiotiques 98

4.2.1. Stratégies de lutte contre les pathogènes 100

4.2.2. Les voies de signalisation 104

4.2.3. Les peptides et protéines antimicrobiens 110

4.3. Comment les bactéries lactiques influencent l'immunité chez *C. elegans ?* . 114

4.4. Utilisation de *C. elegans* pour étudier les effets antipathogènes des bactéries lactiques 116

5. Conclusion 120

DEUXIEME PARTIE : ÉTUDE EXPERIMENTALE 123

CHAPITRE 1. MATERIELS ET METHODES 125

1. Cultures des souches microbiennes 125

1.1. Souches microbiennes 125

1.2. Milieux de culture 125

2. Expérimentations in vitro : inhibition de la croissance et de la formation de biofilm de C. albicans 125

3. Expérimentations in vivo 127

3.1. Culture du nématode *Caenorhabditis elegans* 127

3.1.1. Souches de *C. elegans* 127

3.1.2. Maintenance des nématodes 127

3.1.3. Synchronisation 128

3.1. Préparation des géloses contenant les souches microbiennes 128

3.2. Évaluation de la croissance de *C. elegans* 129

3.3. Évaluation de la longévité de *C. elegans* 129

3.4. Effets de *L. rhamnosus* Lcr35® sur la candidose 129

3.5. Étude de la présence de *C. albicans* dans l'intestin du ver 130

3.6. Étude du transcriptome de *C. elegans* 131

3.6.1. Extraction des ARN 131

3.6.2. Analyse transcriptomique ciblée 131

3.6.2.1. Reverse transcription des ARN en ADNc 131

3.6.2.2. PCR quantitative 132

3.6.3. Analyse transcriptomique exhaustive par *Next Generation Sequencing* 133

3.6.3.1. Traitement à la DNase I 133

3.6.3.2. Séquençage des ARN messagers 134

3.6.3.3. Analyse fonctionnelle par Gene Ontology 134

3.7. Localisation cellulaire du facteur de transcription DAF-16 134

4. Analyses statistiques 135

CHAPITRE 2. ÉTUDES DES PROPRIETES PREVENTIVES DE LCR35® 137

CHAPITRE 3. ÉTUDES DES PROPRIETES CURATIVES DE LCR35® 159

CHAPITRE 4. ÉTUDE MECANISTIQUE DE LA REPONSE DE *C. ELEGANS* 179

CHAPITRE 5. POTENTIALISATION DE LCR35® PAR LE THIOSULFATE DE SODIUM – ETUDES ET RESULTATS PRELIMINAIRES 215

1. Introduction 215

2. Études in vitro sur cellules intestinales Caco-2 216

2.1. Approche préventive 216

2.2. Approche curative 218

3. Etudes in vivo chez C. elegans 219

3.1. Impact de la potentialisation de Lcr35® sur la longévité du ver 219

3.2. Effet de la potentialisation de Lcr35® par le STS sur l'activité biologique du facteur de transcription DAF-16::GFP 220

3.3. Effet de la potentialisation sur la survie face à l'infection 221

4. Conclusion 222

DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES 225

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 233

ANNEXES 263

ANNEXE 1. ARTICLE DE REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 265

ANNEXE 2. COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE 289

ANNEXE 3. CONSTRUCTION BIOINFORMATIQUE DES AMORCES POUR LE SUIVI PAR RT-PCR QUANTITATIVE DE L'EXPRESSION DE GENES 291

ANNEXE 4. SCRIPT RMARKDOWN POUR L'ANALYSE DES DONNEES DE SURVIE 297

Table des figures

Figure 1 : Arbre phylogénétique de la flore bactérienne colonisant le côlon 33
Figure 2 : Principaux taxons bactériens colonisant le tractus gastro-intestinal chez l'Homme 35
Figure 3 : Évolution de la composition du microbiote humain au cours de la vie 37
Figure 4 : L'axe bidirectionnel microbiote – intestin – cerveau 39
Figure 5 : Effets des lactobacilles vaginaux sur les pathogènes 43
Figure 6 : Sélection de mécanismes associés au pouvoir pathogène de *C. albicans* 49
Figure 7 : *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35® observé en microscopie électronique à balayage 57
Figure 8 : *Bifidobacterium longum* en microscopie électronique à balayage 59
Figure 9 : Effets bénéfiques sur la santé de la consommation de probiotiques 61
Figure 10 : Anatomie générale d'un ver adulte hermaphrodite 86
Figure 11 : Microscopie électronique à balayage de vers mâles 86
Figure 12 : Cycle de vie de *C. elegans* à 22°C 90
Figure 13 : Durée de vie de *C. elegans* N2 nourri avec des bactéries lactiques comparé à des vers nourris avec *E. coli* OP50. 93
Figure 14 : Effets négatifs de *L. salivarius* et *L. reuteri* sur la durée de vie de *C. elegans* 93
Figure 15 : Tissus de *C. elegans* potentiellement infectés par des microorganismes pathogènes. 99
Figure 16 : Les grandes étapes de l'autophagie 101
Figure 17 : Mécanismes moléculaires entre ROS et immunité 103
Figure 18 : Voie DAF-2/Insulin-Like Receptor (DAF-2/ILR) 105
Figure 19 : Voie ERK (Okuyama *et al.* 2010) 107
Figure 19 : Interaction entre les voies de signalisation JNK et Insuline-*like* 109
Figure 20 : Voie DBL-1/TGF-β 109
Figure 22 : Pathogènes et antimicrobiens chez *C. elegans* 111
Figure 23 : Les trois grandes voies impliquées dans la réponse immunitaire de *C. elegans* : p38 MAPK, DAF-2 / Insulin-*like* receptor et JNK 115
Figure 24 : Inhibition de l'adhésion de *C. albicans* par Lcr35® potentialisé en situation préventive 217
Figure 25 : Inhibition de la croissance de *C. albicans* par Lcr35® potentialisé en situation curative 218
Figure 26 : Inhibition de l'adhésion de *C. albicans* par Lcr35® potentialisé en situation curative 219
Figure 27 : Effet du thiosulfate sur la longévité de *C. elegans* 220
Figure 28 : Localisation cellulaire du facteur de transcription DAF-16::GFP en présence de Lcr35® potentialisé 220
Figure 29 : Courbes de survie de *C. elegans* infecté par *C. albicans* et traité préventivement par Lcr35® potentialisé 221

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales bactéries lactiques probiotiques 57
Tableau 2 : API (*Active Pharmaceutical Ingredients*) commercialisés par biose® 59
Tableau 3 : Pathologies et troubles fonctionnels associés à des dysbioses du microbiote intestinal 64
Tableau 4 : Les modèles animaux traditionnels dans la recherche sur le microbiome. 72
Tableau 5 : Caractéristiques comparatives des hôtes utilisés dans les études sur les interactions hôte-pathogène. 72
Tableau 6 : Avantages de l'utilisation de modèles de petits animaux / rongeurs pour la recherche sur les probiotiques 75
Tableau 7 : Sélection de découvertes dans la recherche avec *C. elegans* 82
Tableau 8 : Aperçu des familles de gènes effecteurs antimicrobiens putatifs chez le nématode *Caenorhabditis elegans* 111
Tableau 9 : Interactions pathogènes - bactéries lactiques étudiées dans l'intestin de *C. elegans* ..117
Tableau 10 : Liste des souches de *Caenorhabditis elegans*.....127
Tableau 11 : Séquences des oligonucléotides utilisés comme amorces en PCR quantitative 133
Tableau 12 : Evolution de la concentration de *C. albicans* en présence de Lcr35® potentialisé sur cellules Caco-2.....217

Introduction générale

Avec les progrès de la médecine moderne, les scientifiques ont été capables d'améliorer significativement la santé de la population humaine contribuant à augmenter notre espérance de vie. Cela est passé par une meilleure connaissance de l'anatomie, ainsi qu'une meilleure compréhension de la physiologie et de la génétique de notre organisme, grâce à des techniques chirurgicales moins invasives, mais plus efficaces assistées par de l'imagerie médicale de plus en plus sophistiquée, mais également par l'avènement de l'antibiothérapie. Qu'elle soit antibactérienne ou antifongique, l'antibiothérapie a grandement participé à faire reculer la prévalence des maladies infectieuses, notamment dans les pays développés. Particulièrement actives dans ce secteur, les microbiologies fondamentale et appliquée ont réalisé de nombreuses études mettant en évidence les vulnérabilités des microorganismes face à certaines molécules naturelles ou synthétiques. Ces découvertes ont permis la mise au point d'un très grand nombre d'antibiotiques avec des spectres plus ou moins larges et qui, jusqu'à présent, ont fait leurs preuves d'efficacité.

Cependant, avec l'augmentation inquiétante du nombre de résistances aux antibiotiques, l'apparition dans les centres hospitaliers d'un microorganisme tueur, impossible à éradiquer par des moyens conventionnels, n'est pas à exclure. Il devient alors urgent de trouver des méthodes thérapeutiques alternatives qui soient aussi efficaces que l'antibiothérapie tout en restant sans danger pour les patients. Une de ces méthodes consiste à agir via le microbiote en le renforçant ou en le régénérant au moyen de microorganismes probiotiques. Avec près de 10^{14} bactéries, le microbiote humain, rapidement acquis à la naissance, va évoluer au cours de la vie et jouer un rôle essentiel en tant que barrière contre des espèces pathogènes. En effet, il a été montré qu'un déséquilibre du microbiote ou dysbiose pouvait être la cause ou la conséquence d'un état pathologique. Certains auteurs ont démontré que la restauration d'un microbiote sain était corrélée positivement avec une amélioration de l'état de santé. Les probiotiques peuvent avoir différentes actions au sein d'un microbiote en favorisant la réimplantation de la flore endogène normale et/ou en ayant une activité antimicrobienne vis-à-vis d'un pathogène. Un probiotique dont l'efficacité a été démontrée lors d'essais cliniques contre un placebo et visant une certaine pathologie, est considérée comme étant un *Live Biotherapeutic Microorganism* (LBM) (World Health Organization 2009). Une préparation pharmaceutique contenant un LBM est qualifiée de *Live Biotherapeutic Product* (LBP).

Les maladies infectieuses étant principalement d'origine bactérienne, les probiotiques sont essentiellement utilisés pour le traitement de telles infections. Néanmoins, certains pathogènes eucaryotes comme la levure *Candida albicans*, voient leur prévalence augmenter de manière significative (+1,5 % pour les candidoses invasives selon la Haute Autorité de

Santé), et deviennent également une cible thérapeutique des probiotiques. De plus, le caractère ubiquitaire de cette levure la rend responsable d'infections cutanées, gastro-intestinales et systémiques chez l'Homme, mais aussi vulvo-vaginales chez la femme, ces dernières présentant un caractère récidivant. Une souche bactérienne qualifiée de LBM, *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35®, fait partie depuis quelques années de l'arsenal thérapeutique pour le traitement des candidoses.

Produite depuis 1954 par la société biose® Industrie, précédemment connue sous le nom de Lyocentre, la souche *L. rhamnosus* Lcr35® est commercialisée pour le traitement de dysbioses gastro-intestinales et vaginales. Elle possède des propriétés probiotiques et antipathogènes, notamment anti-*C. albicans*, bien décrite dans la littérature et la preuve d'efficacité a été démontré au moyen d'essais cliniques. En revanche, les mécanismes moléculaires sous-tendant ces propriétés sont encore inconnus et nécessitent la mise en œuvre d'expérimentations sur modèle *in vivo*. Dans ce travail de thèse, le nématode *Caenorhabditis elegans* a été envisagé pour caractériser les mécanismes impliqués dans les capacités probiotiques de Lcr35®.

Ce mémoire de thèse est constitué de deux parties. La première partie est une synthèse de la littérature scientifique et se divise en quatre chapitres. Dans le premier chapitre, le microbiote humain sera présenté avec un focus sur les flores gastro-intestinale et vaginale, mais également un point sur la levure *C. albicans*, retrouvée fréquemment chez l'Homme. Il s'en suit une description des microorganismes à potentiel probiotiques, leurs utilisations thérapeutiques, ainsi que les méthodes de sélection *in vitro* utilisées. Le troisième chapitre sera quant à lui consacré aux modèles *in vivo* permettant l'étude des propriétés de ces souches avec une description détaillée du modèle *C. elegans* dans le dernier chapitre. La seconde partie traitera de l'aspect expérimental de ce travail de recherche. L'ensemble des méthodes employées seront présentées dans un premier temps suivi par, successivement, les travaux concernant les propriétés préventives et curatives de Lcr35® en lien avec l'infection fongique à *C. albicans* puis les études mécanistiques.

Première partie :

Étude bibliographique

Chapitre 1.

Le microbiote humain, un écosystème en équilibre

1. Introduction

Les organismes du règne animal, qu'ils soient simples comme l'abeille *Apis mellifera* ou la mouche *Drosophila melanogaster*, ou bien considérés comme supérieurs et complexes comme la souris *Mus musculus* et l'être humain *Homo sapiens*, sont tous colonisés par de nombreuses communautés microbiennes. L'ensemble des microorganismes retrouvés au sein d'un hôte est ainsi dénommé microbiote tandis que les relations entre le microbiote indigène et l'environnement dans lequel il évolue sont qualifiées de microbiome. Dans le cas de l'Homme, son microbiote est estimé à plus de 10^{12} microorganismes commensaux et symbiotiques soit plus de dix fois le nombre de cellules somatiques (Wang *et al.* 2017). Bien que l'on parle du microbiote humain, il existe en réalité plusieurs microbiotes colonisant l'Homme avec les microbiotes gastro-intestinal, urogénital, pulmonaire, oropharyngé et cutané. En fonction de l'environnement et de ses paramètres physico-chimiques (humidité, pH, température, présence ou non d'oxygène, niveau de potentiel redox), la composition, l'abondance relative et les fonctions des microbiotes peuvent varier considérablement. Les microbiotes gastro-intestinal et urogénital (notamment vaginal) sont de loin les plus étudiés et les mieux caractérisés. Ceux-ci sont présentés plus en détail dans ce chapitre. Cependant, il ne faut pas négliger les autres flores microbiennes et notamment leurs rôles dans la protection de l'organisme.

De récentes recherches ont montré que la plupart des microorganismes vivants retrouvés chez l'Homme jouent un rôle clé dans les relations bénéfiques hôte — microbiote notamment par la production de métabolites, la bioconversion de nutriments, mais également la protection contre les pathogènes (Young 2017). Cependant un déséquilibre du microbiote, ou dysbiose, est également associé à diverses maladies comme : des infections, des troubles de la fonction hépatique, le développement de cancers intestinaux, des troubles métaboliques, respiratoires, mentaux et psychologiques ou l'apparition de maladies auto-immunes (Sartor 2008 ; P. D. Scanlan *et al.* 2008 ; Verhulst *et al.* 2008 ; Wen *et al.* 2008 ; Sekirov *et al.* 2010 ; Al-Assal *et al.* 2018 ; Hartmann *et al.* 2019 ; Pulikkan *et al.* 2019).

De ce fait, il apparaît de plus en plus évident au sein de la communauté scientifique que préserver ou rétablir l'équilibre d'un microbiote permettrait de soigner son hôte. Avec l'avènement des techniques d'analyse à haut débit pour la caractérisation des communautés microbiennes, il nous est à présent possible de décrypter les compositions des flores et leurs fonctions dans les circonstances physiologiques et pathologiques, notamment en adoptant une approche intégrative alliant (méta)génomique, (méta)transcriptomique, (méta)protéomique, métabolomique et immunomique (Gilbert *et al.* 2018). Cependant, caractériser les relations de causes à effets reliant dysbiose, pathologie et activité probiotique représente d'importants challenges scientifiques.

1. Le microbiote gastro-intestinal

Le microbiote gastro-intestinal est la flore microbienne la plus étudiée et la mieux caractérisée parmi les différents microbiotes humains. Le tractus gastro-intestinal de l'Homme, qui représente une très grande surface d'échange (250 à 400 m^2) avec l'environnement, est propice à l'implantation d'une population complexe et dynamique de microorganismes interagissant avec leur hôte (Thursby and Juge 2017). Généralement considéré comme stérile durant le stade fœtal, l'intestin est rapidement colonisé dès la naissance pour ensuite voir sa flore microbienne évoluer constamment au cours de la vie.

1.1. Composition et structure

Un des principaux moteurs ayant permis une meilleure caractérisation du microbiote intestinal a été le développement d'outils moléculaires indépendants des techniques de culture. En effet, pendant longtemps, le microbiote intestinal et notamment sa composition a été étudié par des méthodes culturales (Moore and Holdeman 1974) particulièrement chronophages et entraînant un certain nombre de biais. En effet, seules les bactéries cultivables peuvent être détectées et la sélectivité relative des milieux de culture traditionnels ne permet pas de différencier de manière précise des genres, espèces ou souches bactériennes aux phénotypes proches. Aussi, une grande partie de la composition du microbiote intestinal échappe aux techniques de culture microbienne actuelles, par le fait qu'il est majoritairement composé de bactéries anaérobies strictes. Aujourd'hui, avec l'avènement des techniques d'analyse à haut débit associé à la baisse des coûts du séquençage des acides nucléiques, il est possible de déterminer très précisément la composition d'un microbiote (exemple du microbiote colique, Figure 1). Ainsi les approches de génétique et génomique, telles que le séquençage du gène codant l'ARNr 16S (procaryote), 18S (eucaryote) ou de

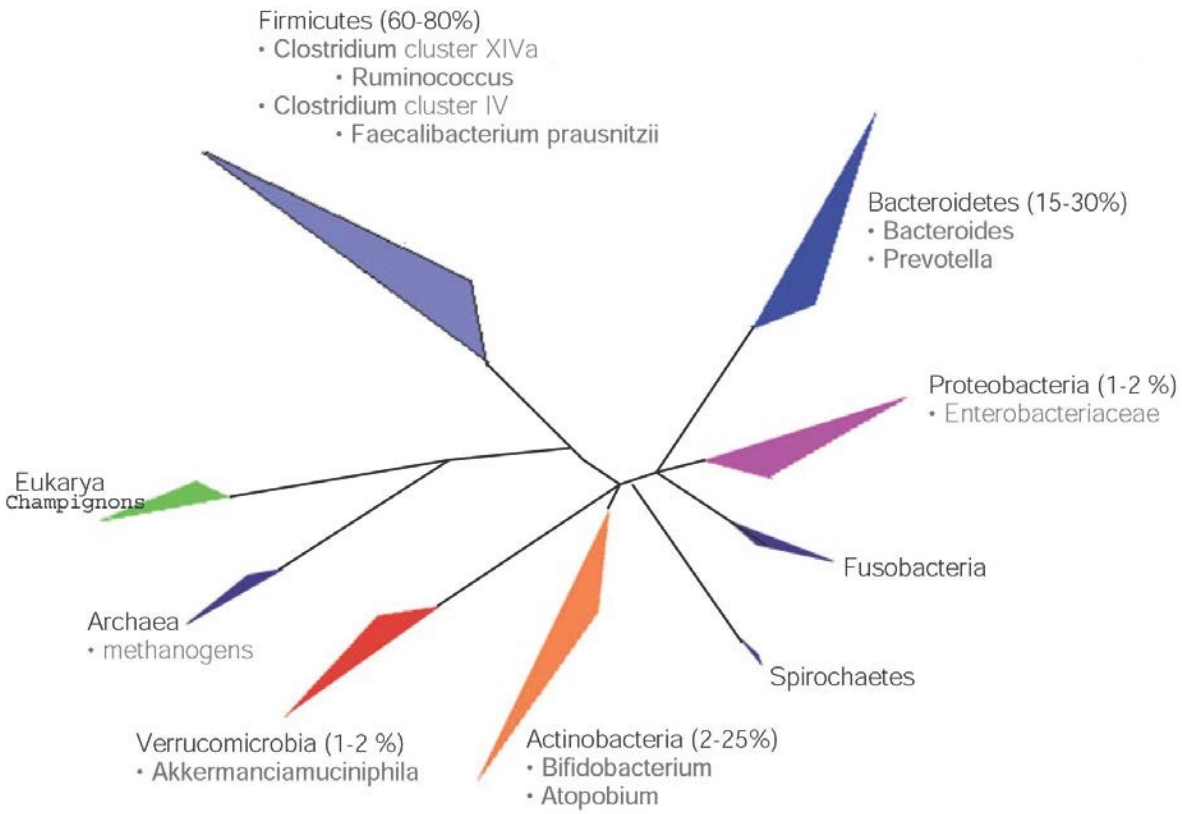


Figure 1 : Arbre phylogénétique de la flore bactérienne colonisant le côlon

Cette représentation schématique montre l'abondance relative des phyla majoritaires du microbiote intestinal humain avec entre parenthèses la proportion de ces phyla dans le microbiote intestinal total. Les taxons les plus importants en santé humaine sont également précisés (Cheng *et al.* 2013).

l'ensemble des gènes d'un microbiote (microbiome), a révélé une diversité microbienne que les méthodes traditionnelles de culture n'avaient pas appréhendée. Ces méthodes d'investigation se sont ensuite incrémentées avec l'avènement des approches de transcriptomique, protéomique, métabolomique permettant d'explorer le microbiote de son potentiel génique à son impact métabolique chez l'hôte. Le premier décryptage de l'ensemble des génomes bactériens trouvés dans notre organisme a été réalisé par le consortium MetaHit, projet européen coordonné par l'INRA. Trois millions de gènes, soit 100 fois plus que le nombre de gènes présents dans le génome humain, ont été identifiés (Junjie Qin *et al.* 2010).

D'un point de vue global, le microbiote intestinal (colon) est dominé par deux phyla bactériens, les *Firmicutes* et les *Bacteroidetes*, qui constituent près de 90 % de la population totale, les *Firmicutes* étant plus abondants que les *Bacteroidetes* (Junjie Qin *et al.* 2010). Les autres phyla bactériens présents dans l'intestin humain sont les *Actinobacteria*, les *Proteobacteria*, les *Verrucomicrobia*, les *Fusobacteria*, les *Cyanobacteria*, les *Spyrochaetes*. Le phylum des Firmicutes est majoritairement composé de bactéries appartenant aux *Clostridia* du groupe XIVa et du groupe IV tels que par exemple *Ruminococcus* et *Faecalibacterium prausnitzii*. Le phylum des *Bacteroidetes* est, quant à lui, représenté par plusieurs espèces de *Bacteroides*, dont *B. thetaiotaomicron*, *B. fragilis*, *B. ovatus*, et *B. caccae*. Le phylum des *Actinobacteria* comprend les *Bifidobacterium*. Chez l'adulte, le microbiote intestinal est dominé par des espèces bactériennes anaérobies strictes. Cependant, des bactéries anaérobies facultatives comme des *Enterobacteriaceae* sont trouvées, mais en nombre relativement faible. L'écosystème intestinal d'un adulte sain est généralement composé de 1000 espèces dont on estime que 60-70% restent incultivables à ce jour. Bien que présentes en plus grand nombre, les bactéries ne sont pas les seuls microorganismes colonisant l'intestin. Les mycètes unicellulaires et filamenteux sont également retrouvés dans cet écosystème et ont un impact sur la santé de l'hôte. Ce mycobiote est ainsi prédominé par certains genres dont *Candida*, *Saccharomyces*, *Fusarium*, *Debaryomyces*, *Penicillium*, *Galactomyces*, *Pichia*, *Cladosporium*, *Malassezia*, *Cyberlindnera* et *Aspergillus* (Hoffmann *et al.* 2013 ; Strati *et al.* 2016 ; Nash *et al.* 2017).

Au sein d'un même individu, le microbiote intestinal présente une très grande variabilité quantitative et qualitative en fonction de sa localisation dans le tube digestif. En effet, celui-ci présente d'importantes différences physico-chimiques (pH, niveau de potentiel redox et d'aérobiose) favorisant la sélection de certains taxons (Figure 2). En raison de son pH très acide et de la présence d'enzymes gastriques, l'estomac a longtemps été considéré comme stérile. Celui-ci abrite en réalité une communauté diversifiée d'environ 10^2 à 10^4 UFC.mL^{-1}. En condition non pathologique, cette communauté est dominée par les *Actinobacteria*,

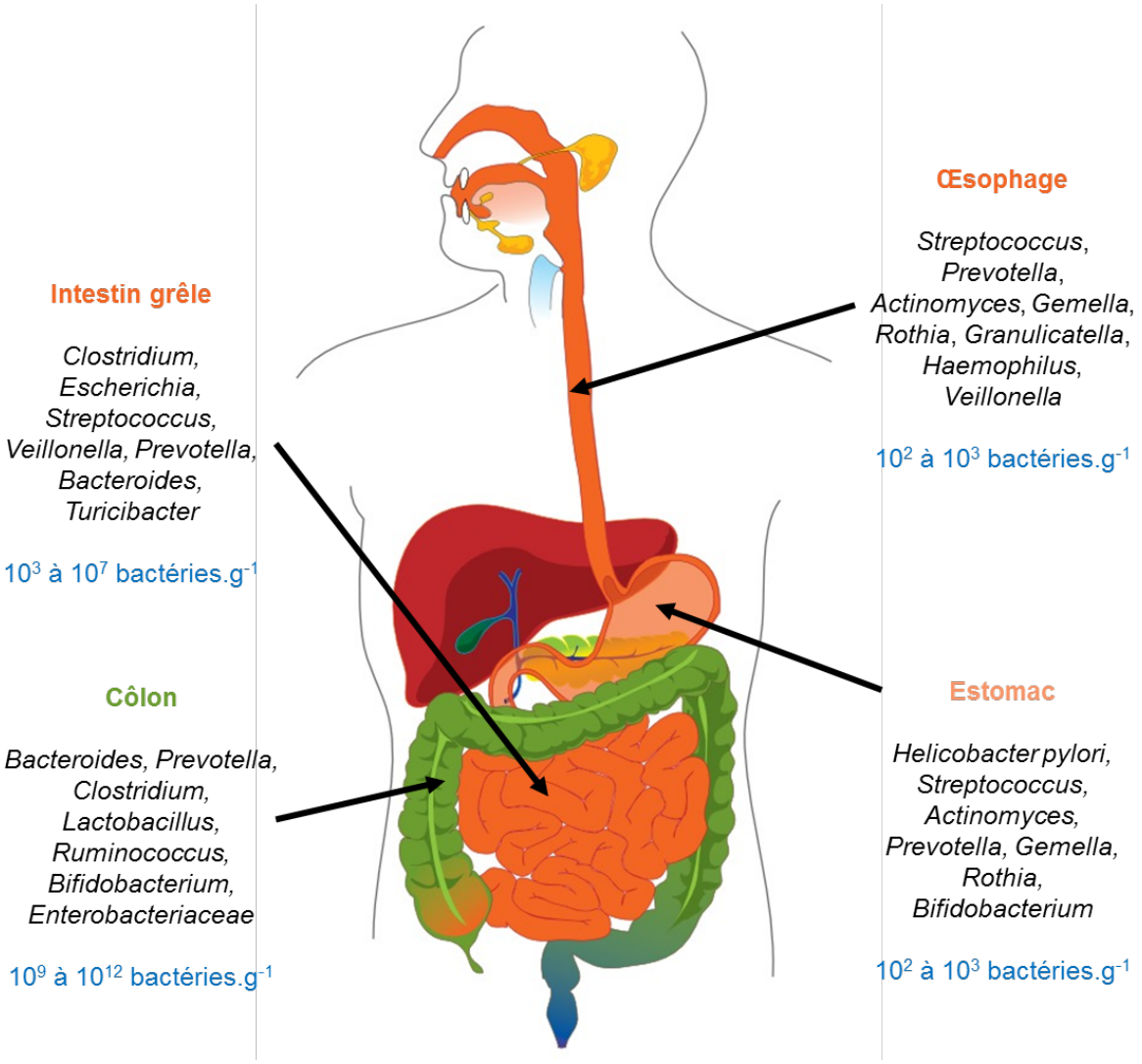


Figure 2 : Principaux taxons bactériens colonisant le tractus gastro-intestinal chez l'Homme

Adapté de Andersson *et al.* 2008 ; Sweeney and Morton 2013 ; El Aidy and van den Bogert 2015 ; Konturek *et al.* 2015 ; O'Callaghan and van Sinderen 2016

Bacteroidetes, *Firmicutes* et les *Proteobacteria* dont le pathogène *Helicobacter pylori*, le genre prédominant étant *Streptococcus*. Sur la totalité de ce microbiote, seulement 20 % des microorganismes sont cultivables en laboratoire, avec principalement des *Clostridium*, *Lactobacillus* et *Veillonella*. Plus récemment, il a été démontré que le microbiote de l'estomac humain avait une composition totalement différente de celle du microbiote des localisations anatomiques supérieures, comme la bouche ou la gorge (Delgado *et al.* 2013). En conséquence, le microbiote gastrique semble être constitué de microbes résidents plutôt que de microorganismes en provenance des organes supérieurs (Ianiro *et al.* 2015). Quant au tube digestif inférieur, celui-ci présente une quantité de biomasse microbienne bien plus importante. Elle est comprise entre 10^3 UFC.g^{-1} au début de l'intestin grêle jusqu'à plus de 10^{12} UFC.g^{-1} dans le côlon. Une partie des bactéries stomacales sont retrouvées dans l'intestin, mais une importante modification structurelle du microbiote intervient au niveau du passage dans l'intestin. En effet, la majeure partie des bactéries aérobies est remplacée par des anaérobies. Cette microflore est représentée par deux phyla dominants, *Firmicutes* et *Bacteroidetes*, tandis que les *Fusobacteria, Verrucomicrobia, Actinobacteria* et *Proteobacteria* constituent les phyla sous-dominants avec des abondances relatives de 1, 2, 5 et 8 %. En ce qui concerne les niveaux taxonomiques inférieurs, il existe une très grande diversité microbienne avec plus de 1800 genres et 16 000 phylotypes identifiés (Hattori and Taylor 2009).

Cette structure de la communauté bactérienne est établie (Junjie Qin *et al.* 2010) vers l'âge de 2 – 3 ans et reste stable tout au long de la vie adulte pour évoluer ensuite avec le vieillissement (Cherbuy *et al.* 2013) en raison d'une certaine plasticité temporelle.

1.2. Évolution temporelle du microbiote intestinal

Le microbiote intestinal présente une certaine plasticité lui permettant d'évoluer avec son hôte (Figure 3). Au cours de sa vie, celui-ci sera soumis à différents facteurs environnementaux qui auront un impact plus ou moins important. Le microbiote intestinal des nouveau-nés et des nourrissons présente peu de stabilité temporelle. Cependant au cours des deux premières années de vie celui-ci tend à se rapprocher d'un microbiote retrouvé chez un adulte et à gagner en stabilité (Palmer *et al.* 2007 ; De Filippo *et al.* 2010 ; Ottman *et al.* 2012). La composition initiale de cet écosystème est en partie dépendante du mode de naissance (césarienne ou voie vaginale), de l'alimentation (lait maternel ou artificiel) et des conditions environnementales (De Filippo *et al.* 2010). Les premiers jours de vie sont souvent caractérisés par la présence de communautés dominées par un ou deux groupes taxonomiques (*Lactoccocus lactis*, *Escherichia coli*) qui évoluent avec le développement physiologique de l'enfant (Park *et al.* 2005). Le processus d'établissement du microbiote du

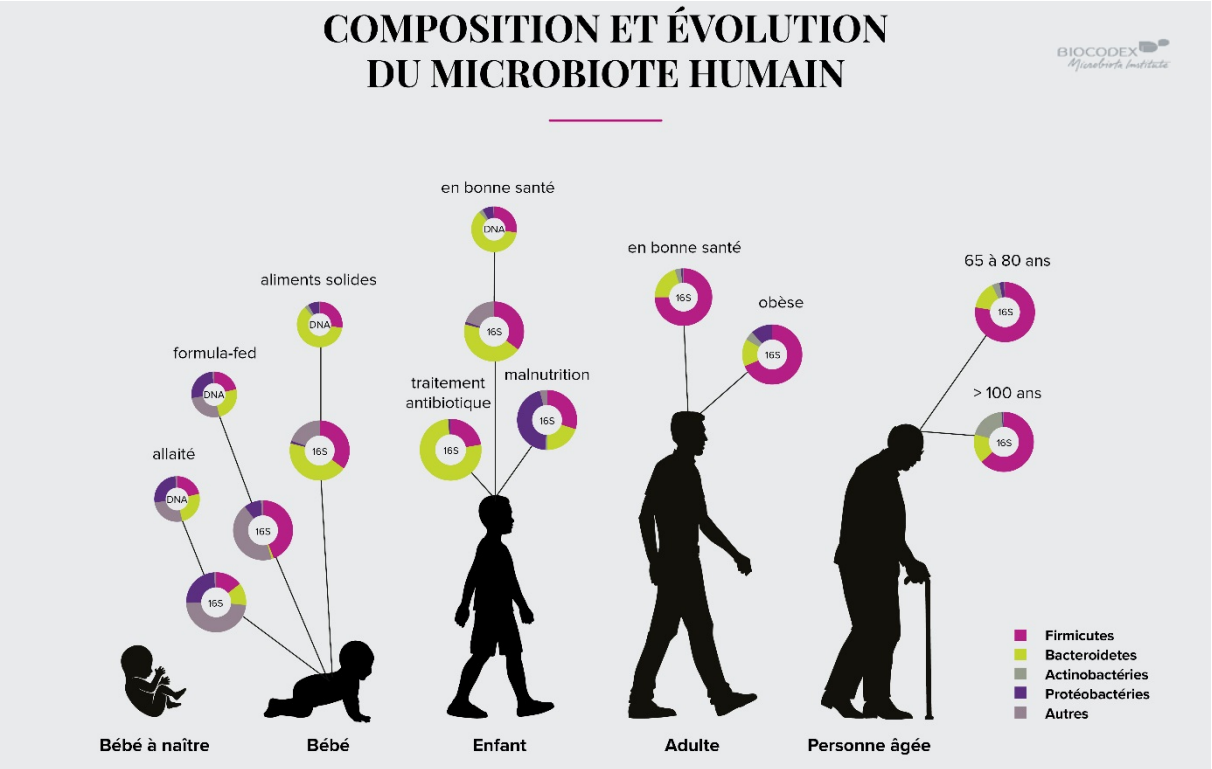


Figure 3 : Formation et évolution du microbiote humain aux différentes étapes de la vie et selon les perturbations

Source : https://www.pressonline.com/bmi-pro/fr/phototheque/

nouveau-né a été étudié en détail par des techniques de métagénomique (De Filippo *et al.* 2010). Après une période de stabilité (composition déjà décrite), chez une personne d'un âge adulte avancé, une diminution importante de l'abondance des bifidobactéries est observée (Zoetendal *et al.* 1998 ; Hopkins and Macfarlane 2002 ; Ottman *et al.* 2012). De la même manière, chez les personnes centenaires, il a été constaté une baisse très importante de la diversité globale. Malgré ces variations de composition, les propriétés fonctionnelles du microbiote intestinal sont maintenues. Cela suggère la présence d'un microbiome central présent d'une manière stable au cours de la vie. Deux des objectifs des projets Human Microbiome Project (HMP) et MetaHit étaient de déterminer à quel point le microbiote humain influe sur la santé de son hôte, et de démontrer l'existence d'un microbiome central (Junjie Qin *et al.* 2010). Chez certaines personnes en bonne santé ou souffrant de diverses pathologies, des variations spécifiques ont été identifiées, dans le cas notamment des maladies inflammatoires ou de l'obésité (Jiayang Qin *et al.* 2010 ; Delzenne *et al.* 2011).

1.3. L'axe microbiote – intestin – cerveau

L'axe intestin-cerveau est un système de communication qui intègre la signalisation neuronale, hormonale et immunologique entre l'intestin et le cerveau et fournit au microbiote intestinal et à ses métabolites une voie potentielle permettant d'accéder au cerveau (Mayer 2011) (Figure 4). Ce système de communication est bidirectionnel, ce qui permet au cerveau d'influencer les fonctions gastro-intestinales (telles que la motilité, la sécrétion et la production de mucine) ainsi que les fonctions immunitaires (Mayer 2011) (notamment la modulation de la production de cytokines par les cellules du système immunitaire muqueux). Des facteurs émotionnels tels que le stress ou la dépression influencent le développement des maladies gastro-intestinales chroniques telles que les maladies intestinales inflammatoires (Mawdsley and Rampton 2005) (les deux plus courantes étant la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse) et le syndrome de l'intestin irritable (Mayer 2011). Elles sont également associées à une dysbiose (DuPont and DuPont 2011). Il a été démontré que le stress influence l'intégrité de l'épithélium intestinal et modifie la motilité intestinale, les sécrétions intestinales et la production de mucine, modifiant ainsi l'habitat des bactéries résidentes et favorisant des modifications de la composition ou de l'activité microbienne (Collins and Bercik 2009). En outre, la libération de catécholamines dans l'intestin induite par le stress pourrait influencer la communauté microbienne en interférant avec la signalisation interbactérienne ainsi qu'avec l'expression des gènes de virulence (Kaper and Sperandio 2005 ; Freestone *et al.* 2008).

Des études utilisant des bactéries probiotiques fournissent une preuve supplémentaire de la communication le long de l'axe microbiote – intestin – cerveau et révèlent le caractère

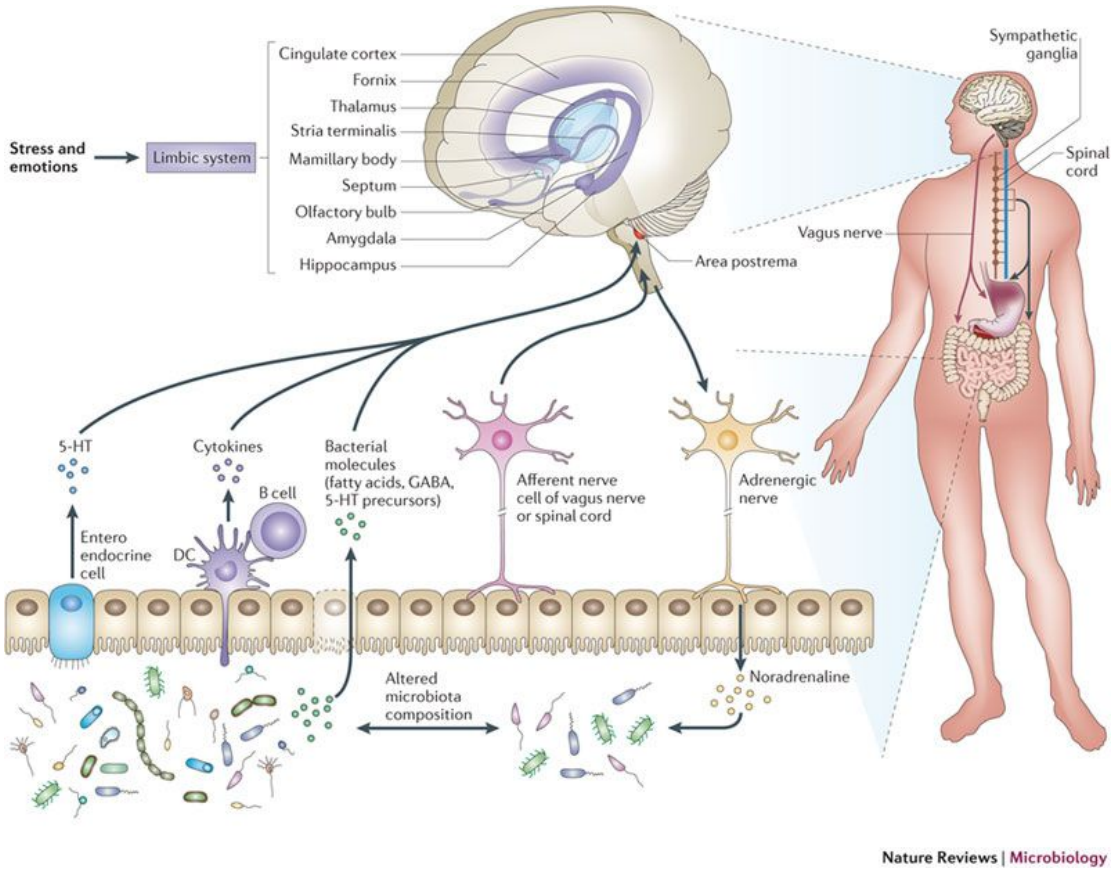


Figure 4 : L'axe bidirectionnel microbiote – intestin – cerveau

Les mécanismes putatifs par lesquels les bactéries influencent le système nerveux central (SNC) comprennent : les métabolites bactériens circulant par voie sanguine, la libération de cytokines par les cellules immunitaires muqueuses et la libération d'hormones intestinales telles que la 5— hydroxytryptamine (5 — HT) à partir de cellules entéroendocrines. Les voies neurales afférentes, dont le nerf vague, semblent impliquées. Ces signaux interagissent avec le SNC via l'*area postrema*. Le stress et les émotions peuvent influencer la composition microbienne de l'intestin via la modification de la physiologie intestinale. Alternativement, les hormones de stress de l'hôte telles que la noradrénaline peuvent influencer l'expression des gènes bactériens ou la signalisation entre bactéries, ce qui pourrait modifier la composition microbienne et l'activité du microbiote.

DC : cellules dendritiques, **GABA** : acide γ aminobutyrique (Collins *et al.* 2012).

souche-spécifique de ces interactions. En effet, l'administration du probiotique *Bifidobacterium longum subsp. infantis* induit une diminution du taux de dopamine et de 5— hydroxytryptamine (5 — HT) dans le cortex frontal chez le rat, mais sans entraîner de changement perceptible du comportement de celui-ci (Desbonnet *et al.* 2008). Cependant, dans un modèle de comportement mimant semblable à la dépression induite chez la progéniture du rat séparée prématurément de sa mère, la même bactérie normalise l'attitude et induit également des modifications des taux de noradrénaline et du facteur de libération de corticotropine (CRF) dans le cerveau (Desbonnet *et al.* 2010). De plus, *B. longum* NCC3001 normalise le comportement de type anxiété et l'expression du facteur neurotrophique dérivé du cerveau (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*, BDNF) dans l'hippocampe de souris atteintes de colite légère à modérée (provoquée par une infection parasitaire chronique) (Bercik *et al.* 2010). L'administration de consortia de bactéries probiotiques semble également affecter la fonction cérébrale. Un prétraitement des souris avec la combinaison *L. rhamnosus* R0011 et *Lactobacillus helveticus* R0052 empêche le dysfonctionnement de la mémoire induit par le stress et normalise l'expression du BDNF dans la région CA1 de l'hippocampe (Gareau *et al.* 2011). Ces résultats indiquent que les réponses aux bactéries probiotiques dépendent en partie du paramètre comportemental étudié et du modèle utilisé pour perturber le comportement. Ces exemples concernant les effets des probiotiques sur le cerveau ont permis d'apporter la preuve de l'intérêt d'employer des probiotiques intestinaux pour le traitement de troubles affectant le système nerveux central. Ces études ont permis d'illustrer la diversité et la nature fortement souche-dépendante des effets induits par les probiotiques sur le cerveau et leurs mécanismes sous-jacents, et démontrent que les actions spécifiques d'une souche ne sont généralement pas partagées par les autres membres de l'espèce (Collins *et al.* 2012).

2. Le microbiote vaginal

2.1. Description générale

Au même titre que le microbiote gastro-intestinal, la flore vaginale exerce un rôle important dans la protection de l'appareil reproducteur féminin vis-à-vis des pathogènes. Cette microflore, dominée à 90 % par des *Lactobacillus*, est appelée flore de Doderleïn, du nom du gynécologue Alfred Doderleïn qui l'a décrite en 1892 (Lepargneur and Rousseau 2012).

Initialement définie par des méthodes phénotypiques, la composition détaillée du microbiote vaginal et l'abondance relative des espèces bactériennes ont récemment été déterminées par séquençage à haut débit du gène de l'ARNr 16S. Au moins cinq

communautés microbiennes, désignées ici sous le nom de *Community State Type* (CST), ont été identifiées (Ravel *et al.* 2014 ; Torcia 2019). Quatre CST sont dominées par des espèces de *Lactobacillus* hautement adaptées à l'environnement vaginal (J. Ravel *et al.* 2011 ; Kroon *et al.* 2018). D'une manière générale, le CST-I est représenté par *L. crispatus*, le CST-II par *L. gasseri*, le CST-III par *L. iners* et le CST-V par *L. jensenii*. Le CST-IV est constitué de communautés polymicrobiennes, avec une prévalence d'espèces strictement anaérobies appartenant aux genres *Gardnerella*, *Atopobium*, *Mobiluncus*, *Megasphoera, Prevotella*, *Streptococcus*, *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Dialister*, *Bacteroides*, etc. (Fredricks *et al.* 2005 ; J. Ravel *et al.* 2011 ; Gajer *et al.* 2012). Ce dernier est très courant chez les femmes noires et hispaniques, puisqu'il représente 10 % des individus aux États-Unis et 60 % en Afrique du Sud (Anahtar *et al.* 2015 ; Ravel *et al.* 2011). Les facteurs à l'origine des différences ethniques et géographiques dans les communautés cervico-vaginales ne sont pas encore connus, mais pourraient inclure des différences dans le comportement sexuel, les pratiques d'hygiène, la colonisation rectale, la génétique de l'hôte (Muzny and Schwebke 2016), la grossesse et le mode d'accouchement (DiGiulio *et al.* 2015) ou l'alimentation (Thoma *et al.* 2011). Néanmoins, il a été montré que la composition du microbiote vaginal était sujette à une certaine variabilité en composition et en complexité selon l'état physiologique de la femme (cycle menstruel, âge), principalement due aux changements hormonaux (Greenbaum *et al.* 2019). À titre d'exemples, les auteurs ont montré que le microbiote présentait une composition très stable durant la grossesse tandis que chez la femme ménopausée, la communauté microbienne tend à s'enrichir en anaérobies (*Bacteroides*, *Mobiluncus*) et en *Gardnerella vaginalis* au détriment des *Lactobacillus*.

2.2. La dysbiose vaginale

Même si la flore de Doderleïn dispose de très grandes aptitudes à lutter contre les pathogènes, elle n'en reste pas moins fragile. En effet, les macrolides et tétracyclines, des antibiotiques, souvent utilisés pour le traitement d'infections gynécologiques, ont également une activité bactéricide chez les *Lactobacillus*. Dès la mise en place d'une antibiothérapie, il est fréquent qu'une dysbiose vaginale apparaisse. Il est recommandé de les remplacer, dans la mesure du possible, par le métronidazole ou les quinolones qui affectent peu la flore commensale et notamment les lactobacilles producteurs d'H_2O_2 (Lepargneur and Rousseau 2012). Il est possible d'évaluer l'état du microbiote vaginal à l'aide du score de Nugent (Nugent *et al.* 1991). Une flore normale, dominée par les lactobacilles est caractérisée par un score compris entre 0 et 3. Une flore intermédiaire contenant peu de lactobacilles et associés à d'autres groupes bactériens est caractérisée par un score compris entre 4 et 6. La

flore est altérée, mais cet état n'est pas forcément associé à un trouble pathologique. Enfin, la disparition des lactobacilles avec apparition d'une vaginose bactérienne (prolifération d'espèces anaérobies polymorphes) est associée à un score compris entre 7 et 10. Cette pathologie, affectant un tiers des femmes au moins une fois au cours de leur vie, correspond à la colonisation des muqueuses par des bactéries anaérobies, notamment *G. vaginalis* avec une réduction plus ou moins importante de la proportion de lactobacilles (Shipitsyna *et al.* 2013). Cependant, le score de Nugent ne permet pas une caractérisation optimale d'un état physiologique et doit être complété par d'autres méthodes comme le critère d'Amsel ou la PCR quantitative (Sha *et al.* 2005).

2.3. Mécanismes antipathogènes des *Lactobacillus*

Les lactobacilles commensaux colonisent la muqueuse vaginale grâce à la formation d'un biofilm conférant ainsi une protection efficace contre les pathogènes. Différents mécanismes sont dès lors mis en place (Figure 5) à travers trois grandes actions : l'inhibition de la croissance d'un pathogène, de son adhésion et de son expansion.

2.3.1. Inhibition de la croissance des souches pathogènes

La présence des lactobacilles à la surface de l'épithélium vaginal permet une modification de ses propriétés chimiques notamment de son pH. À partir du glucose issu de l'hydrolyse du glycogène, les bactéries vont avoir une activité fermentaire et produire des acides organiques, notamment l'acide lactique et contribuer au maintien d'un pH proche de 4. Ce pH acide permet une inhibition de la croissance de la plupart des pathogènes (*Chlamydia*, *Neisseria*, *Gardnerella*) à l'exception de *C. albicans* (Tachedjian *et al.* 2017). De plus, certains lactobacilles comme *L. crispatus* et *L. jensenii* produisent du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (Hertzberger *et al.* 2014). Cet oxydant et les radicaux dérivés excrétés par ces bactéries exercent ainsi un effet bactéricide ou bactériostatique non spécifique, notamment sur des bactéries ne possédant pas de catalase (Sgibnev and A Kremleva 2015). L'action bactéricide est due à l'oxydation de composés cellulaires indispensables à la survie dont les protéines et les acides nucléiques. Des études *in vitro* ont montré l'effet inhibiteur de l'H_2O_2 produit par les lactobacilles en aérobie sur *G. vaginalis*, *E. coli* et *Staphylococcus aureus* en particulier. Par ailleurs, de fortes concentrations en lactobacilles, producteurs de H_2O_2, en présence de peroxydase et d'halogénure, inhibent *in vitro* le virus VIH (Ocaña *et al.* 1999). En plus de l'abaissement du pH et de la production d'H_2O_2, certaines souches sont également capables de synthétiser des bactériocines et l'arginine désaminase. Les bactériocines sont des molécules peptidiques ciblant de manière spécifique les membranes des microorganismes en

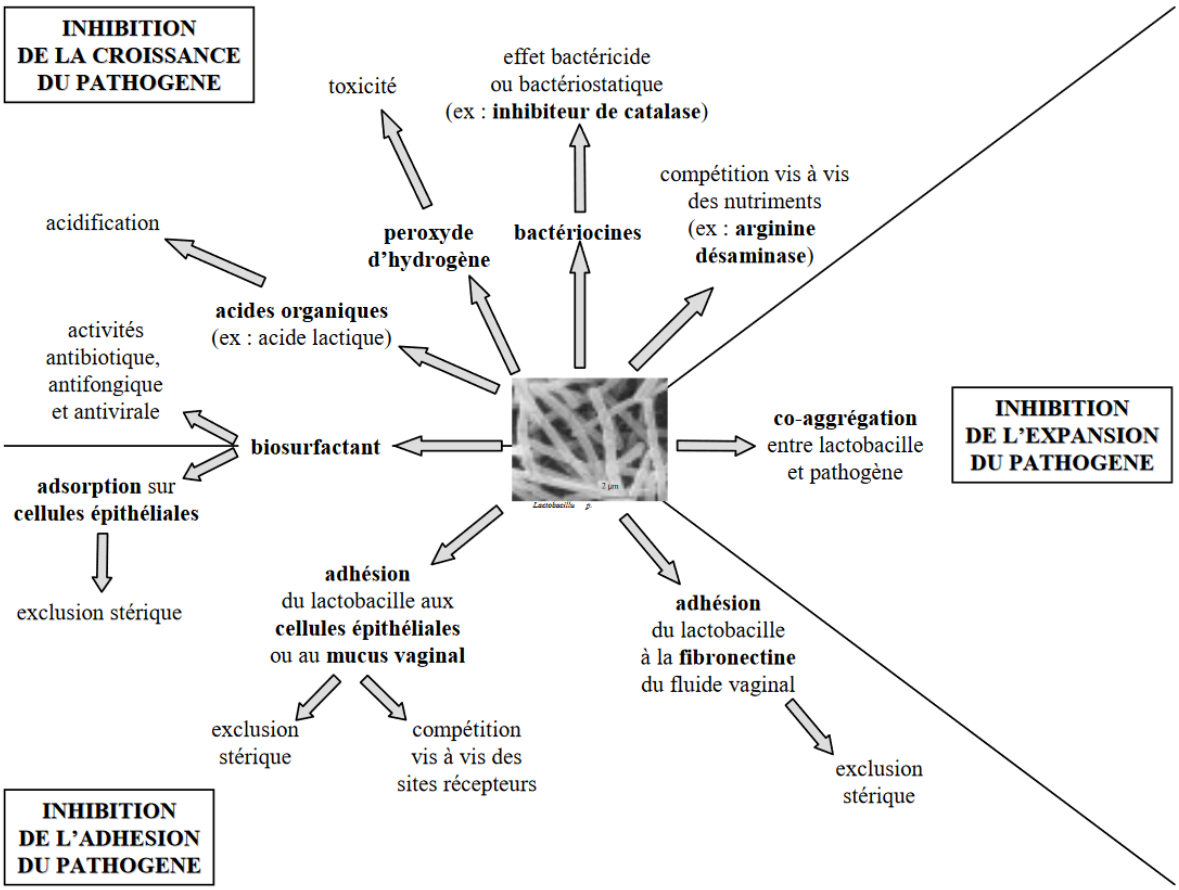


Figure 5 : Effets des lactobacilles vaginaux sur les pathogènes

(Lepargneur and Rousseau 2012)

formant des pores et provoquant une fuite du contenu cytoplasmique et donc la mort de la cellule. Certaines bactériocines ont également une activité inhibitrice de la catalase de *Neisseria gonorrhoeae* renforçant de manière synergique l'action du peroxyde d'hydrogène (Zheng *et al.* 1994). Les lactobacilles, possédant l'enzyme arginine désaminase, inhiberaient la croissance et la prolifération des bactéries anaérobies pathogènes associées à la vaginose : ils métabolisent l'arginine en citrulline et ammoniaque, et privent ainsi les pathogènes de cet acide aminé. Une étude sur différentes femmes traitées avec une souche de *L. brevis* ayant une forte activité arginine désaminase, a montré un net déclin de la concentration en polyamines vaginales ainsi qu'un rétablissement de l'équilibre de l'écosystème. Par ailleurs, l'utilisation de l'arginine influencerait la synthèse d'oxyde nitrique (médiateur de l'immunité) et minimiserait ainsi l'inflammation (Famularo *et al.* 2001).

2.3.2. Inhibition de l'adhésion et de l'expansion

L'adhésion d'un microorganisme à la surface d'une muqueuse est un des facteurs essentiels à sa colonisation. Cette adhésion peut être de nature spécifique ou non et met en jeu respectivement des interactions entre adhésines bactériennes et des récepteurs cellulaires ou bien des interactions de faible énergie entre les bactéries et les cellules. La présence de lactobacilles dans la flore commensale joue un rôle de barrière naturelle à l'adhésion des pathogènes. En effet, les lactobacilles en occupant la sphère vaginale, rentrent directement en compétition vis-à-vis des sites récepteurs disponibles. Les pathogènes étant en général minoritaires au début de l'infection par rapport à la flore native, la probabilité qu'ils parviennent à se fixer sur un récepteur est statistiquement faible. De plus, l'encombrement stérique des surfaces induites par la colonisation des lactobacilles rend difficile l'implantation d'un microorganisme extérieur (Lepargneur and Rousseau 2012).

Les *Lactobacillus* vont également limiter l'expansion de pathogènes aux tissus sains en empêchant leur accès aux récepteurs et leur adhésion aux cellules épithéliales par coagrégation grâce à un processus souche spécifique (Reid 2001). Une étude a montré que *L. acidophilus*, *L. gasseri* et *L. jensenii*, isolés à partir du tractus vaginal, coagrègent avec *C. albicans*, *E. coli* et *G. vaginalis*, mais pas avec *Streptococcus agalactiae* (Boris *et al.* 1998 ; Younes *et al.* 2012). Chez certains *Lactobacillus* vaginaux, un facteur promoteur de l'agrégation (APF) a été mis en évidence. Un peptide APF de 2 kDa hydrophile et actif à pH acide, a notamment été isolé chez *L. gasseri* (Boris *et al.* 1997).

Ainsi, les altérations du microbiote vaginal peuvent être la cause de troubles pathologiques affectant la santé globale, mais aussi la qualité de vie des patientes.

3. *Candida albicans*, une levure pathogène opportuniste des tractus digestif et vaginal

3.1. Généralités

Le genre *Candida* regroupe environ 200 espèces de levures caractérisées par un bourgeonnement multilatéral et par la production de filaments à l'exception de *C. glabrata* (Silva *et al.* 2012). *C. albicans*, principale levure pathogène pour l'homme, est retrouvé chez 80 % de la population. *C. albicans* est phylogénétiquement proche du probiotique bien caractérisé et commercialisé *Saccharomyces cerevisiae*. D'un point de vue génétique, le génome de la levure est composé de 8 paires de chromosomes correspondant à environ 16 Mb et codant pour 6400 gènes. Le code génétique de *C. albicans* possède une particularité, le codon CUG code pour une sérine et non pour une leucine (Santos and Tuite 1995). Bien que retrouvé majoritairement sous forme commensale saprophyte, cette levure dispose également d'un pouvoir pathogène opportuniste lui permettant de coloniser aussi bien les muqueuses (infections superficielles) que le système sanguin (infections systémiques).

Les infections superficielles peuvent se produire aussi bien chez des personnes saines qu'immunodéprimées principalement due à des modifications physico-chimiques (pH, disponibilité des nutriments, etc.) ou biologiques de la peau (dysbiose) et des muqueuses, ou bien à la suite d'une maladie (Runeman *et al.* 2000 ; Kashem and Kaplan 2016 ; Palese *et al.* 2018). Les candidoses cutanées ont majoritairement lieu dans les zones où la transpiration est élevée ou celles ayant subi une blessure telle qu'une brûlure.

La candidose buccale, communément appelée muguet, est une infection fréquente chez les patients ayant reçu une antibiothérapie à large spectre, les personnes immunodéprimées, surtout celles atteintes du SIDA, ainsi que chez le nouveau-né (Mane *et al.* 2010). Les candidoses œsophagiennes sont, comme pour la candidose buccale, le signe d'une infection par le VIH (Fidel 2006). Traitées aux cas par cas, elles font l'objet de recommandations internationales auxquelles participe le Centre National de Référence des Mycoses Invasives et Antifongiques.

Les candidoses génitales sont également fréquentes et dues dans 80 % des cas à l'espèce *C. albicans*. Elles ne sont pas considérées comme des maladies sexuellement transmissibles et peuvent être le signe d'un diabète (Malazy *et al.* 2007 ; Gunther *et al.* 2014). Les causes de récidives sont nombreuses : l'antibiothérapie répétée, la contraception physique (diaphragme ou stérilet), les hormones œstrogènes, les corticoïdes et

immunosuppresseurs. Des facteurs génétiques semblent être impliqués dans les formes récidivantes.

3.2. Infections fongiques à *Candida albicans*

3.2.1. Candidoses digestives

L'œsophage est le principal foyer des candidoses digestives bien qu'elles puissent toucher l'ensemble du tractus digestif, de l'estomac au colon. En raison de leur caractère commensal, *Candida* peut être retrouvé dans les selles sans être le signe d'une pathologie. Les *Candida spp*. représentent la première cause d'œsophagite et *C. albicans*, là encore, est la principale espèce incriminée. Les facteurs de risque sont l'immunodépression, la malnutrition ainsi que les maladies endocriniennes dont le diabète. L'œsophagite à *Candida* est un marqueur de l'infection au VIH. Elle survient lorsque les globules blancs (LT CD4) sont inférieurs à 150 cellules par microlitre et est souvent associée à une candidose de la sphère orale. Celle-ci peut constituer un des premiers symptômes du SIDA. Les manifestations cliniques de cette localisation sont dominées par la dysphagie et les douleurs rétrosternales. Le diagnostic repose sur l'endoscopie dont l'aspect est celui de plaques blanches sur une muqueuse érythémateuse (ANOFEL 2014).

3.2.1. Candidoses vulvovaginales

La vulvovaginite à *Candida* est fréquente. Il est responsable d'un tiers des cas de vulvovaginite chez les femmes en âge de procréer et 70 % des femmes rapportent avoir eu une vulvovaginite à candidose à un moment donné de leur vie. Environ 8 % des femmes souffrent de vulvovaginite à *Candida* récidivante. *C. albicans* (dans environ 90 % des cas) est l'agent pathogène le plus souvent responsable, la plupart des cas restants étant causés par *C. glabrata*. La vulvovaginite à *Candida* est causée par l'inflammation des muqueuses vulvovaginales consécutives à une infection par *Candida*, le plus souvent *C. albicans*. La plupart des femmes sont porteuses saines de *C. albicans* où il fait partie de la flore commensale vaginale. Dès lors, la vulvovaginite à *Candida* nécessite à la fois la présence de la levure dans le vagin / la vulve ainsi que les symptômes suivants : irritation, démangeaisons, dysurie ou inflammation (Farhan *et al.* 2019).

En raison d'une automédication largement répandue, les données épidémiologiques détaillées ne sont pas disponibles pour ce type de pathologie. De plus, le diagnostic repose principalement sur une évaluation clinique (méthode culturale) surestime la maladie, 10 % des femmes étant asymptomatiques et présentant une culture positive. Les facteurs de risque

reconnus de vulvovaginite aiguë à *Candida* comprennent l'antibiothérapie à large spectre, les maladies endocriniennes (diabète), un taux élevé d'œstrogènes ou l'immunosuppression (SIDA, transplantation). Bien que la vulvovaginite à *Candida* soit plus fréquente chez les femmes sexuellement actives, elle ne semble pas être sexuellement transmissible. Les patientes atteintes de vulvovaginite à *Candida* récurrente (définie comme quatre épisodes ou plus de vulvovaginite à candidose prouvée en culture) ont des facteurs génétiques qui les rendent susceptibles aux infections fongiques récurrentes. Ces facteurs peuvent également prédisposer à une hypersensibilité à *Candida* (Jeanmonod and Jeanmonod 2019).

3.2.2. Candidoses systémiques

L'incidence des candidoses systémiques a augmenté en France au cours des dix dernières années. En effet, selon un rapport de la Haute Autorité de Santé, elles représentent en moyenne 2,5 cas pour 100 000 personnes par an. De plus, l'analyse des tendances pour l'ensemble des infections fongiques invasives montrait une augmentation de l'incidence (+1,5 %) dont 7,7 % pour les candidémies (Haute Autorité de Santé 2017). Elles peuvent être la conséquence de contaminations nosocomiales chez des patients cathétérisés (Kojic and Darouiche 2004). Elles peuvent aussi être consécutives au passage vers le sang et les organes de levures ayant colonisé des sites digestifs et/ou urogénitaux. Cette migration est favorisée par un affaiblissement des muqueuses après une chimiothérapie et par des traitements antibiotiques prolongés principalement chez les patients hospitalisés (Mohammadi and Foroughifar 2016). Les facteurs de risque de candidoses systémiques sont nombreux : neutropénie prolongée, allo et autogreffe de moelle, corticothérapie, chirurgie digestive lourde, réanimation, prématurité, brûlures étendues, etc.

Sur le plan épidémiologique et au niveau mondial, *C. albicans* est responsable d'environ la moitié des infections. Viennent ensuite, en France, *C. glabrata*, *C. tropicalis* et *C. parapsilosis* (Mavor *et al.* 2005), les autres espèces étant moins fréquentes. En fonction de l'espèce mise en cause, la prise en charge thérapeutique sera variable en raison de la résistance intrinsèque aux antifongiques (Charles *et al.* 2016). Le diagnostic des candidoses systémiques est souvent difficile et tardif. Il s'appuie sur les symptômes de fièvre prolongée et résistante aux traitements antibiotiques. Le diagnostic repose en grande partie sur une hémoculture positive ainsi qu'un examen sérologique (Yera *et al.* 2001). Accompagné par le retrait du cathéter contaminé, un traitement antifongique est systématiquement mis en place. La mortalité reste voisine de 40 %.

3.3. Mécanismes de pathogénicité

La capacité de *C. albicans* à infecter une grande variété de tissus chez l'hôte est due à son large éventail de facteurs de virulence. La transition morphologique entre les levures et les formes hyphales, l'expression d'adhésines et d'invasines à la surface des cellules, le thigmotropisme, la formation de biofilms, la commutation phénotypique et la sécrétion d'enzymes hydrolytiques sont considérés comme des facteurs de virulence (Mayer *et al.* 2013) (Figure 6). La transition entre les formes levures et hyphales est appelée dimorphisme et il a été suggéré que les deux formes de croissance sont importantes pour la pathogénicité (Jacobsen *et al.* 2012). La forme hyphale s'est révélée plus invasive que la forme levure tandis que la forme de levure, plus petite, serait principalement impliquée dans la dissémination (Saville *et al.* 2003). Cette transition est par ailleurs sous le contrôle de facteurs environnementaux comme le pH, un pH inférieur à 6 favorisant la forme levure, ou les phénomènes de *quorum sensing* (Ramon *et al.* 1999 ; Hornby *et al.* 2001). Les mutants qui sont incapables de former des hyphes dans des conditions de culture *in vitro* ont généralement une virulence diminuée (Lo *et al.* 1997). Cependant, la formation d'hyphes est conditionnée à l'expression d'un sous-ensemble de gènes codant pour des facteurs de virulence qui ne sont pas impliqués dans la filamentation. Ces protéines associées comprennent la protéine de paroi hyphale Hwp1, les protéines associées à l'hyphe Ece1 et Hyr1, la protéine de type agglutinine Als3 et les protéases aspartiques sécrétées Sap4, Sap5 et Sap6. Le *contact sensing* est un élément important de l'environnement qui déclenche la formation d'hyphes et de biofilms chez *C. albicans*. Au contact d'une surface, les cellules de levure basculent dans un mode de croissance hyphale. Sur certains substrats, tels que l'agar ou les muqueuses, ces hyphes peuvent envahir le substrat. Le contact avec les surfaces solides induit également la formation de biofilms (Kumamoto 2008). Sur les surfaces présentant des topologies particulières, une croissance hyphale directionnelle (thigmotropisme) peut se produire. Les travaux de Brand *et al.* ont démontré que le thigmotropisme de *C. albicans* est régulé par l'absorption de calcium extracellulaire par les canaux calciques Cch1, Mid1 et Fig1. Des mécanismes supplémentaires incluent le module polarisome Rsr1 / Bud1-GTPase. Ces travaux ont également apporté la preuve que le thigmotropisme de *C. albicans* est nécessaire pour que les cellules épithéliales soient complètement endommagées et pour observer la virulence chez la souris (Brand *et al.* 2007, 2008 ; Brand and Gow 2009).

C. albicans possède un ensemble spécialisé de protéines (adhésines) qui assure la médiation de l'adhésion à d'autres cellules de *C. albicans*, à d'autres microorganismes, à des surfaces abiotiques et à des cellules hôtes (Verstrepen and Klis 2006). Les adhésines de *C.*

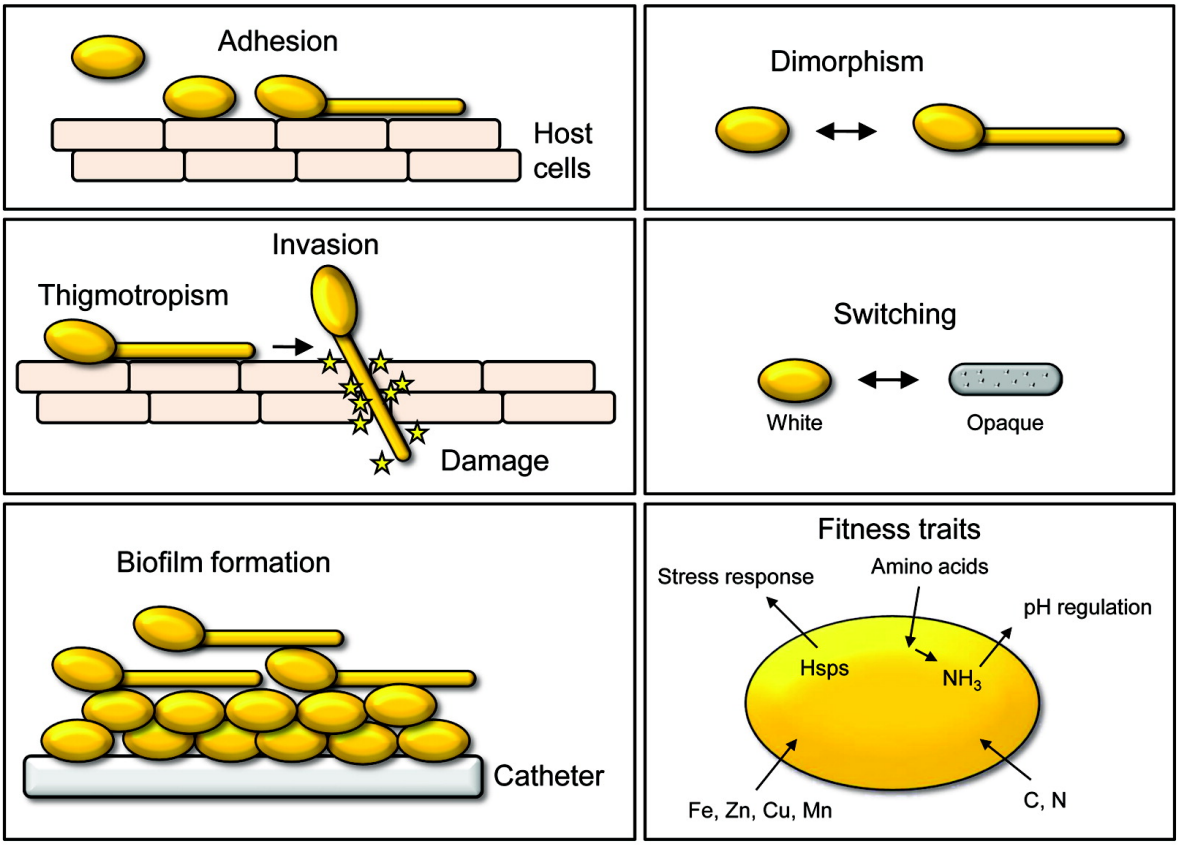


Figure 6 : Sélection de mécanismes associés au pouvoir pathogène de *C. albicans*

(Mayer *et al.* 2013)

albicans les mieux étudiées sont les protéines de type *agglutinine-like séquence* (ALS), qui forment une famille de huit membres (Als1–7 et Als9). Les gènes de l'ALS codent pour des glycoprotéines de surface cellulaire liées à du glycosylphosphatidylinositol (GPI). Parmi les huit protéines Als, l'adhésine Als3 associée à la formation d'hyphes est particulièrement importante pour l'adhésion (Murciano *et al.* 2012). L'expression du gène *ALS3* est régulée positivement lors de l'infection de cellules épithéliales orales *in vitro* et lors d'une infection vaginale *in vivo* (Cheng *et al.* 2005). Une autre adhésine importante de *C. albicans* est Hwp1, qui est une protéine liée au GPI associée aux hyphes. Hwp1 sert de substrat aux transglutaminases de mammifères et cette réaction peut lier de manière covalente les hyphes de *C. albicans* aux cellules hôtes (Staab *et al.* 1999). Un mutant *hwp1*Δ / Δ présentait une adhérence réduite aux cellules épithéliales buccales et une virulence atténuée dans un modèle murin de candidose systémique (Staab *et al.* 1999 ; Sundstrom 2002). Il a également été démontré que Hwp1 et Als3 contribuaient à la formation de biofilms en jouant le rôle d'adhésines complémentaires (Nobile *et al.* 2008).

Après l'adhésion aux surfaces des cellules hôtes et la croissance des hyphes, ceux-ci peuvent sécréter des hydrolases pour faciliter la pénétration active dans ces cellules. De plus, les hydrolases sécrétées améliorent l'efficacité de l'acquisition de nutriments extracellulaires (Naglik *et al.* 2003). Parmi ces hydrolases, *C. albicans* sécrète des protéases aspartiques (Saps) qui comprennent dix membres, Sap1–10. Sap1–8 sont sécrétés et libérés dans le milieu environnant, tandis que Sap9 et Sap10 restent liés à la surface de la cellule (Naglik *et al.* 2003 ; Taylor *et al.* 2005 ; Albrecht *et al.* 2006). Il a été démontré que Sap1–3 était nécessaire pour endommager l'épithélium humain reconstitué (RHE) *in vitro* et pour l'expression de la virulence dans un modèle murin d'infection systémique (Schaller *et al.* 1999). Cependant, la contribution relative de Saps à la pathogénicité de *C. albicans* est controversée. Des résultats récents indiquent que les Saps ne sont pas nécessaires pour l'invasion de RHE et que Sap1–6 sont indispensables à la virulence dans un modèle murin de candidose disséminée (Lermann and Morschhäuser 2008).

4. Conclusion

À l'aide des méthodes empiriques basées sur des tests phénotypiques, mais surtout grâce aux approches à haut débit, les scientifiques ont pu mettre en évidence la diversité des communautés microbiennes hébergées par le corps humain. Même si toute cette diversité n'est pas encore totalement caractérisée, un grand nombre d'études ont mis en évidence un lien étroit entre la santé de l'homme et l'équilibre de son microbiome, une dysbiose pouvant

être la cause ou la conséquence d'un trouble pathologique. Différentes approches comme l'antibiothérapie ou l'usage des antifongiques ont été utilisés pour lutter contre les pathogènes. Cependant l'apparition des résistances et le fait que ces traitements puissent être contre-indiqués, car favorisant eux-mêmes la dysbiose, les microbiotes sont apparus comme des cibles thérapeutiques intéressantes pour traiter les causes sous-jacentes des troubles. Une approche alternative s'est donc de plus en plus répandue : l'administration de probiotiques dont l'intérêt sera présenté dans le prochain chapitre.

Chapitre 2.

Les microorganismes probiotiques

1. Introduction

Les microorganismes probiotiques ont été définis de manière officielle en 2001 par l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO) et l'Organisation mondiale de la Santé (OMS). Ces deux organisations décrivent les probiotiques comme étant des « microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent des effets positifs sur la santé, au-delà des effets nutritionnels traditionnels » (FAO and WHO 2001). Cette définition, donnée de manière relativement tardive dans l'histoire de l'utilisation des probiotiques, n'est pas complète dans la mesure où ces microorganismes n'ont pas vocation à être uniquement utilisés par voie orale. En effet, de nombreux travaux de recherche ont été réalisés ou sont en cours pour des utilisations autres que gastro-intestinales. Certaines souches ont des applications commerciales intestinales et vaginales avec, en guise d'exemple, *L. rhamnosus* Lcr35® retrouvé dans plusieurs Active Pharmaceutical Ingredient (API) : Lcr restituo® pour les applications intestinales et Lcr regenerans® pour les indications vaginales (biose 2016).

Par ailleurs, pour qu'un microorganisme donné puisse bénéficier de l'appellation probiotique, celui-ci ne doit représenter aucun danger pour l'hôte. Or, il a été démontré récemment par une équipe de l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA) de Toulouse que cela n'était pas toujours cas, en particulier pour certaines souches d'*E. coli* considérées alors comme probiotiques. La souche *E. coli* Nissle, isolée en 1917 par le professeur allemand Alfred Nissle chez un soldat ayant échappé à une sévère épidémie de shigellose, en est un parfait exemple. Elle est administrée chez des patients souffrants de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), mais présente une génotoxicité avérée en raison de la synthèse de colibactine pouvant provoquer des cassures double-brin de l'ADN des cellules de l'épithélium intestinal. L'instabilité génétique associée à ces cassures peut induire à terme l'apparition de cancer (Olier and Oswald 2012).

2. Généralités sur les probiotiques

2.1. Historique

L'être humain, les animaux et les plantes cohabitent dans un monde colonisé par d'innombrables microorganismes dont la diversité est encore largement sous-estimée. Aujourd'hui, avec les techniques modernes de microbiologie, nous sommes capables d'observer et d'étudier cette microflore, mais, le besoin des hommes de connaissances et de compréhension de l'invisible est relativement ancien. Les premiers écrits jetant les bases de la microbiologie remontent à l'an 30 av. J.-C. avec la série de livres *Rerum Rusticarum Libri Tres* (Trois livres sur l'agriculture) du savant romain Marcus Terentius Varro. Celui-ci a en effet écrit « Si dans un lieu quelconque il y a des marécages, là se développent des animaux tellement petits que les yeux ne les peuvent voir, et qui, pénétrant dans le corps avec l'air, par la bouche ou les narines, produisent de graves maladies ». Il aura fallu attendre les années 1500 avec la découverte du microscope et les travaux de Athanasius Kircher au début des années 1600 pour voir apparaître l'association entre des organismes vivants invisibles à l'œil nu et le développement de maladies.

À la fin du XIX^{e} siècle, le scientifique Ellie Metchnikoff, un des élèves de Louis Pasteur, s'intéresse à la longévité exceptionnelle des paysans bulgares, réputés pour leur consommation importante de yaourt fermenté, aujourd'hui appelé yaourt bulgare. Le bactériologiste a été le premier à suggérer que l'intestin humain ainsi que l'alimentation pouvaient être à l'origine de la propagation de mauvais microbes, mais que celle-ci pouvait aussi être le vecteur de bactéries utiles. Ces bactéries ralentiraient le processus de vieillissement via une interaction synergique avec l'hôte. Le concept de probiotique venait d'être découvert.

Depuis, un très grand nombre de microorganismes différents avec de potentielles propriétés probiotiques ont été isolés et font l'objet de commercialisation, la plupart appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. Différentes formes galéniques ont été mises au point afin de répondre aux besoins thérapeutiques spécifiques des patients (*i.e.* gélules gastriques, comprimés vaginaux).

Aujourd'hui, les nombreuses études portant sur les probiotiques ont prouvé les effets bénéfiques sur l'organisme à différents niveaux : meilleure assimilation des nutriments, barrière anti-pathogène, activation des défenses immunitaires, etc. Dans les années 1990, la mise en évidence que le microbiote intestinal représente un « second cerveau »

(Gershon 1999) va conforter l'hypothèse que cette flore intestinale joue un rôle bien plus important que ce qui était communément admis et qu'il convient de l'étudier.

2.2. Les principales espèces probiotiques

Les microorganismes probiotiques représentent un groupe d'organismes microscopiques hétérogènes dans la mesure où tous ne font pas partie du règne des procaryotes même s'ils sont majoritaires. En effet, certains eucaryotes comme les levures, bien que minoritairement représentés, ont des propriétés probiotiques intéressantes.

2.2.1. Les levures

La majorité des levures décrites comme probiotiques appartiennent au genre *Saccharomyces* avec les espèces *S. cerevisiae* et *S. boulardii*. Cette dernière, isolée en 1920 en Indochine par Henri Boulard sur la peau de litchis et de mangoustans[1] (McFarland 2010), a été étudiée pour ses capacités à réduire les symptômes liés aux gastro-entérites, notamment les douleurs intestinales (Czerucka *et al.* 2007 ; Edwards-Ingram *et al.* 2007 ; Hatoum *et al.* 2012 ; Palma *et al.* 2015). Concernant *S. cerevisiae*, plus communément appelée levure de bière ou de boulangerie, bien que ses effets bénéfiques sur la santé aient été prouvés, cette espèce n'est pas utilisée commercialement pour le traitement de pathologie chez l'Homme (Palma *et al.* 2015). Plus récemment, une nouvelle levure, ne faisant pas partie du genre *Saccharomyces*, a été décrite pour ses propriétés probiotiques : il s'agit de *Kluyveromyces marxianus*. Elle est traditionnellement retrouvée dans le kéfir, le fromage et isolée à partir du lactosérum et du lait caillé de vache (Quarella *et al.* 2016), elle possède une très bonne capacité à adhérer aux cellules épithéliales de l'intestin tout en modulant les réponses immunitaires et inflammatoires (Maccaferri *et al.* 2012).

2.2.2. Les bactéries

Parmi les procaryotes probiotiques, nous noterons la présence, une nouvelle fois, d'une certaine hétérogénéité tant du point de vue morphologique, avec aussi bien des coques que des bacilles, que du point de vue taxonomique. En effet, même si les bactéries probiotiques sont dominées par les espèces dites lactiques, nous retrouvons également certains *Bacillus* comme *B. subtilis*, *B. megaterium* ou *B. licheniformis* (Duc *et al.* 2004 ; Cutting 2011) ainsi que certains *E. coli* comme évoqué précédemment.

[1] Fruit du mangoustanier (*Garsiana mangostana*), originaire d'Asie du Sud-Est

Si nous nous intéressons aux groupes des bactéries lactiques, *i.e.* produisant de l'acide lactique par fermentation, nous pouvons remarquer que plusieurs taxons sont regroupés sous cet intitulé avec principalement *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* dont quelques espèces sont indiquées dans le Tableau 1

D'une manière plus marginale, nous pouvons également citer *Streptococcus thermophilus*, *L. lactis* ou même *Enteroccocus faecalis* (Bhardwaj *et al.* 2010).

Bien entendu, il est difficile de donner une liste exhaustive de l'ensemble des bactéries qualifiées de probiotiques compte tenu de leur nombre de plus en plus important.

2.2.2.1. *Le genre* Lactobacillus

Le genre *Lactobacillus* est actuellement constitué de plus de 170 espèces (Goldstein *et al.* 2015) dont la plus grande partie possède le statut GRAS (*Generally Recognized As Safe*) (Salvetti *et al.* 2012). Ce sont des bactéries commensales des tractus gastro-intestinal et vaginal humains bien que dans de très rares cas certaines souches puissent présenter un pouvoir pathogène opportuniste (Goldstein *et al.* 2015). La classification taxonomique de ce genre est particulièrement complexe. Celle-ci est principalement basée sur des approches moléculaires, car les tests phénotypiques sont peu discriminants. Une récente étude phylogénétique, utilisant les séquences des gènes codant pour les ARN ribosomaux 16S, a révélé que le genre *Lactobacillus* était en réalité divisé en 15 groupes de 3 espèces ou plus, ouvrant la voie à une reclassification dans un avenir proche (Salvetti *et al.* 2018). D'un point de vue phénotypique, ce sont des bacilles Gram+ non sporulés, catalase—, acidophiles, anaérobies ou aérotolérants (Salvetti *et al.* 2012). Ils sont caractérisés par un métabolisme énergétique purement fermentaire bien qu'une étude ait montré l'existence d'une possible chaîne respiratoire (Brooijmans *et al.* 2009). En fonction des capacités fermentaires, les lactobacilles sont classés selon trois groupes (Kandler 1983) :

- les homofermentaires stricts utilisent la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas (ou glycolyse) pour transformer au moins 80 % du glucose en pyruvate puis en lactate ;
- les hétérofermentaires stricts utilisent deux voies pour dégrader les glucides : celles des pentoses-phosphate et partiellement la glycolyse. Ce type fermentaire entraîne une production de lactate, d'acétate, d'éthanol et de dioxyde de carbone ;
- les hétérofermentaires facultatifs qui utilisent aussi bien la glycolyse que la voie des pentoses-phosphates.

Tableau 1 : Principales bactéries lactiques probiotiques

Adapté de la thèse d'Emilie Burguin (2014)

Genres	Espèces	
Lactobacillus	*rhamnosus*	*acidophilus*
	casei	*bulgaricus*
	gasseri	*reuteri*
	plantarum	*sporogenes*
Bifidobacterium	*longum*	*breve*
	infantis	*bifidum*
	adolescentis	
Lactococcus	*cremoris*	*lactis*
Enterococcus	*faecium*	*faecalis*

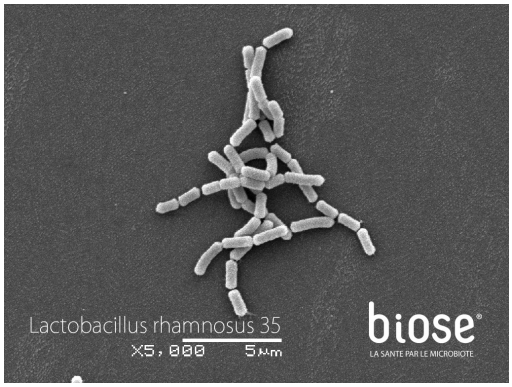


Figure 7 : *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35® observé en microscopie électronique à balayage

L. rhamnosus Lcr35® (Figure 7) fait partie de ce dernier groupe. Elle est commercialisée depuis 1954 par biose® et produite sur son site aurillacois. Depuis, plusieurs formulations industrielles ont été mises au point pour des applications spécifiques, principalement intestinales et vaginales. Ces différents « *Active Pharmaceutical Ingredients* » sont rassemblés dans le Tableau 2. Pour chaque application thérapeutique, de même que pour la souche native, des études précliniques et cliniques ont été réalisées afin :

- de caractériser phénotypiquement et phylogénétiquement la souche (Forestier *et al.* 2001 ; Coudeyras, Jugie, *et al.* 2008 ; Coudeyras, Marchandin, *et al.* 2008 ; Evrard *et al.* 2011) ;
- de vérifier que Lcr35® répond à la définition d'un probiotique en suivant les critères d'éligibilité couramment admis (Nivoliez *et al.* 2012 ; Muller *et al.* 2014 ; Nivoliez *et al.* 2015) ;
- de s'assurer de l'innocuité et de l'efficacité des API en conditions réelles lors d'essais cliniques (de Champs *et al.* 2003 ; Petricevic and Witt 2008 ; Bohbot and Cardot 2012a ; Dapoigny *et al.* 2012 ; Dausset *et al.* 2018).

2.2.2.2. *Le genre* Bifidobacterium

Initialement *Lactobacillus bifidus*, les bactéries du genre *Bifidobacterium* constituent un groupe de microorganismes du type bacille Gram + ayant une morphologie variable bien qu'ils apparaissent souvent avec des extrémités ramifiées comme c'est le cas pour *B. longum* (Figure 8) (Weiss and Rettger 1934). Les bifidobactéries se différencient des lactobacilles par leur catabolisme glucidique. Celles-ci utilisent la voie bifide ou de la fructose -6— phosphate phosphocétolase permettant la conversion des hexoses en acétate (Pokusaeva *et al.* 2011).

3. Sélection de souches et caractérisation *in vitro* de leurs propriétés probiotiques

Avant de pouvoir être qualifiée de probiotique, une souche doit être capable de remplir un certain nombre de critères précis (Thakur *et al.* 2016) basés sur des aspects de sécurité, fonctionnels et technologiques.

Historiquement, d'un point de vue sécurité, il était couramment admis qu'une souche probiotique devait être isolée depuis le tractus intestinal avant d'être caractérisée phénotypiquement et génotypiquement puis mise à disposition de la communauté scientifique dans une collection reconnue. Aujourd'hui les sources potentielles de probiotiques sont plus variées, mais dans tous les cas il faut vérifier de l'innocuité d'une souche au travers de l'étude

Tableau 2 : API (*Active Pharmaceutical Ingredients*) commercialisés par biose®

Nom du produit	Substance active	Forme galénique	Applications	Statut réglementaire
Lenia	Lcr restituo®	Sachet ou gélule	Traitement d'appoint des troubles diarrhéiques chez l'enfant et l'adulte	Médicament avec AMM
Floréa	Lcr lenio™	Gélule	Amélioration du confort intestinal et traitement du syndrome de l'intestin irritable	Complément alimentaire
Gynophilus	Lcr regenerans	Gélule ou comprimé à libération prolongée (Gynophilus LP)	Régénération de la flore vaginale et empêche la colonisation par des pathogènes	Dispositif médical
Gynoconfort	Lcr quiescens®	Gélule	Confort urinaire	Complément alimentaire

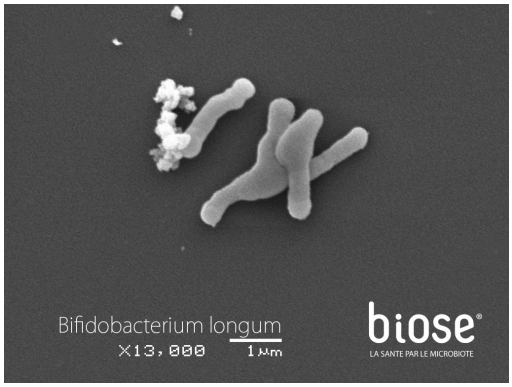


Figure 8 : *Bifidobacterium longum* en microscopie électronique à balayage

de son potentiel pouvoir pathogène grâce à tests expérimentaux :

- la recherche d'une activité hémolytique ;
- la recherche de la production d'enzymes hydrolytiques telles que des glycosidases ou des protéases ;
- la recherche de la production de toxines ; la quantification des amines biogènes ;
- la recherche de gène de résistance aux antibiotiques et l'absence de transfert vers et depuis d'autres souches ;
- la recherche de la résistance à des antibiotiques en déterminant leurs concentrations minimales inhibitrices (CMI).

Une fois l'innocuité de la souche avérée, il convient de caractériser ses propriétés fonctionnelles selon différentes approches :

- le niveau de survie *in vitro* des probiotiques potentiels aux conditions du tractus digestif à savoir la résistance à l'acidité gastrique et à la bile doit être mesuré. La réalisation séquentielle de ces tests a été suggérée par certains auteurs afin de se rapprocher des conditions physiologiques réelles (Papadimitriou *et al.* 2015) ;
- les capacités d'adhésions sur des cellules épithéliales doit être évaluée et les propriétés physico-chimiques des membranes déterminées (Lee *et al.* 2015) ;
- les propriétés antimicrobiennes, notamment l'inhibition d'un pathogène doivent être caractérisées (Saxelin *et al.* 2005 ; Polak-Berecka *et al.* 2010 ; Ratsep 2014). Cette étape passe notamment par la mise en évidence des molécules actives ou par la mise en évidence de la stimulation des réponses immunitaires de l'hôte (Tharmaraj and Shah 2009 ; Šušković *et al.* 2010 ; Arqués *et al.* 2015 ; Choi and Chang 2015) ;
- l'activité acidifiante réalisée par les bactéries lactiques doit être mesurée. En effet, elle joue notamment un rôle prépondérant dans la restauration d'une flore vaginale équilibrée, notamment à la suite d'une vaginose bactérienne (Petricevic and Witt 2008). Aussi, il faut souligner le fait qu'un probiotique ne va pas se limiter à une seule action, mais va bien agir sur l'écologie d'un microbiote tout entier de même que sur l'hôte de manière plus ou moins locale, notamment grâce aux effets métaboliques et immunomodulateurs (Figure 9) ;
- une souche probiotique doit conserver son potentiel probiotique durant le procédé de fabrication industrielle, mais également dans le produit fini, notamment pendant son stockage avant l'utilisation par le consommateur. L'influence des procédés

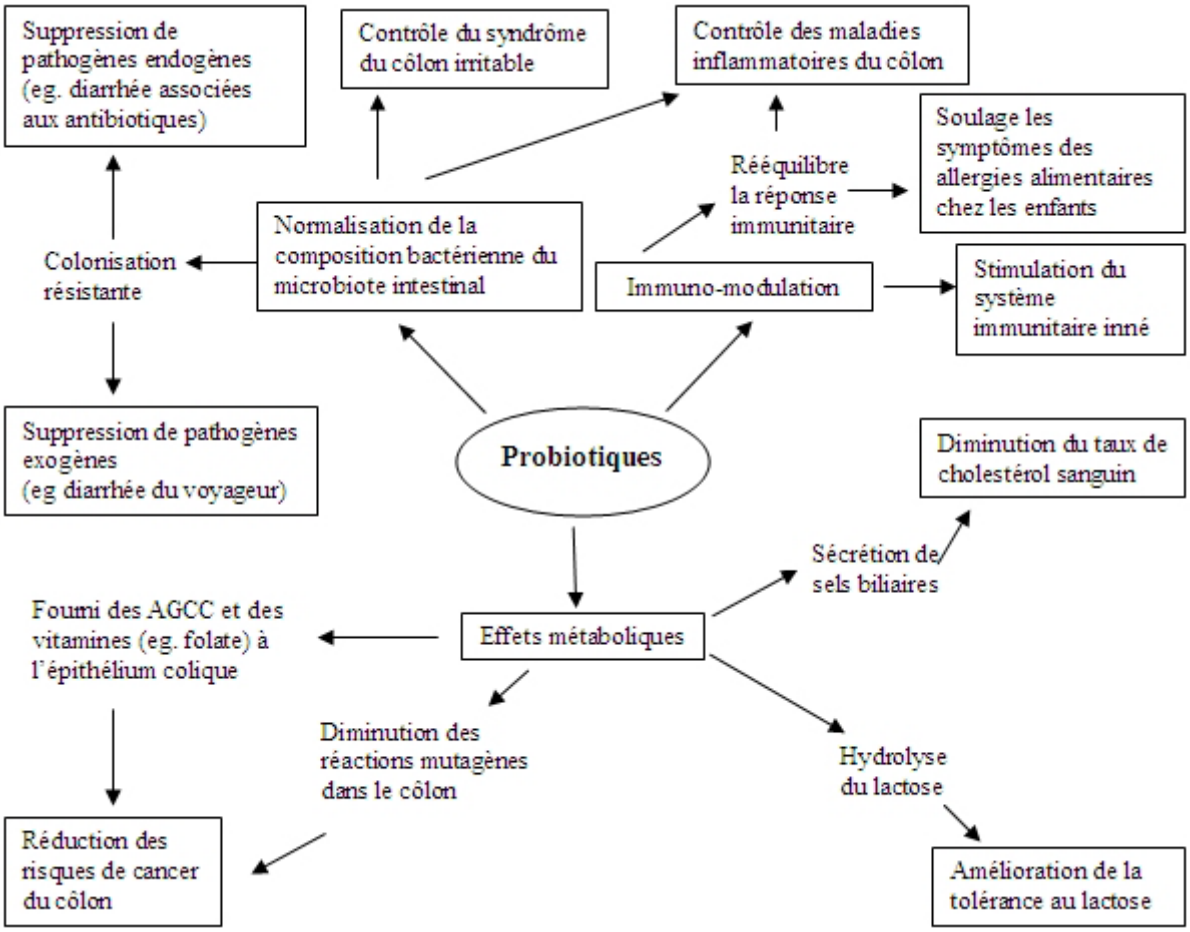


Figure 9 : Effets bénéfiques sur la santé de la consommation de probiotiques

(Saarela *et al.* 2000)

technologiques utilisés doit être étudiée.

Bien évidemment, en plus de la satisfaction de ces critères, il est indispensable que le probiotique apporte des effets positifs pour l'hôte. Pour une souche donnée, les effets sur l'hôte peuvent varier en fonction du procédé de production appliqué. C'est sur cette notion de « *Live Biotherapeutic Products* » que reposent les produits à base de Lcr35® ou de *L. crispatus*, fabriqués par l'entreprise aurillacoise biose®.

Afin de pouvoir tester *in vivo*, une souche microbienne, que ce soit chez l'Homme ou n'importe quel animal, des études préalables *in vitro* sont nécessaires à la caractérisation des potentiels effets probiotiques.

Cependant, les conditions opératoires peuvent à nouveau entraîner un biais. En effet, si l'on prend l'exemple de la synthèse d'une toxine ou bien d'une enzyme comme une protéase, celle-ci peut tout à fait être sous régulée lors du test *in vitro* et rester indétectable, le résultat est alors faussement négatif (Papadimitriou *et al.* 2015).

Au-delà de la caractérisation phénotypique des probiotiques, ceux-ci sont de plus en plus étudiés d'un point de vue moléculaire à l'aide de méthodes omiques. Plusieurs aspects des mécanismes moléculaires qui sous-tendent les propriétés probiotiques ont depuis été élucidés. Par exemple, des analyses en protéomique ont montré que les lactobacilles activaient la glycolyse afin de produire de l'ATP et résister au pH gastrique et à la bile lors de leur passage dans le tractus gastro-intestinal (Siciliano and Mazzeo 2012). Une seconde a montré l'implication de la protéine SlpA (*surface layer protein A*) dans le processus d'adhésion de *L. acidophilus* aux cellules Caco-2 (Ashida *et al.* 2011). Au cours de la dernière décennie, l'avènement des technologies omiques a permis l'étude des organismes probiotiques au niveau du génome entier (Gueimonde and Collado 2012). Aujourd'hui, les méthodologies de métagénomique révèlent la composition d'écosystèmes complexes et leur biologie (Junjie Qin *et al.* 2010 ; Upadrasta *et al.* 2011). Toutes les niches du corps humain contiennent des microbiomes qui divergent en fonction du compartiment spécifique, de l'âge et des habitudes alimentaires de l'individu et de nombreux autres facteurs, notamment environnementaux et génétiques (Jacques Ravel *et al.* 2014). Les techniques métaomiques offrent pour la première fois les outils appropriés pour caractériser le comportement *in vivo* des probiotiques en considérant l'holobionthe, contrairement aux conditions simulées impliquant des cultures microbiennes pures ou en nombre limitées. À mesure que les technologies omiques deviennent plus performantes et moins chères, le séquençage du génome des microorganismes devient une pratique courante. L'incorporation de nouvelles données fonctionnelles via la transcriptomique et la protéomique à haut débit dans des bases de données facilitera à terme l'évaluation *in silico* du potentiel probiotique de microorganismes

candidats. Bien que très puissante, l'analyse *in silico* ne pourra pas remplacer totalement les expérimentations *in vivo* et *in vitro*. Ceci ouvre ainsi la voie à l'utilisation de modèles comme *Caenorhabditis elegans*, présentant des avantages certains sur les modèles cellulaires tout en étant d'utilisation plus simple que les animaux supérieurs. À mesure que notre compréhension de l'aspect moléculaire des propriétés probiotiques s'améliorera, nous pourrons concevoir des tests *in vitro* et *in vivo* plus efficaces et plus fiables. Enfin, l'inventaire du microbiome humain a déjà ouvert la porte à la possibilité de considérer de nouvelles catégories de microorganismes comme probiotiques potentiels au-delà des candidats habituels (à savoir les bactéries lactiques et les bifidobactéries) (Papadimitriou *et al.* 2015).

4. Rôles des probiotiques dans l'équilibre des microbiotes

Le corps humain abrite des écosystèmes bactériens extrêmement riches et divers à tel point qu'ils sont qualifiés de sixième organe. À titre d'exemple, le nombre de microorganismes assurant la colonisation du tractus digestif est estimé à environ 100 trillions (10^{14}) (Ley *et al.* 2006). Cet « organe », possédant une fabuleuse capacité à s'autoréguler, est indispensable au fonctionnement de notre organisme. La flore intestinale participe au processus de digestion et d'assimilation des nutriments, mais il s'avère aussi que le microbiote joue un rôle dans la régulation des voies métaboliques, dans la lutte contre les pathogènes ainsi que dans la stimulation du système immunitaire. Or, cet écosystème peut subir des perturbations d'origines diverses pouvant provoquer une dysbiose. La compréhension des causes et conséquences des dysbioses a permis de découvrir qu'elle pouvait être le point de départ d'états pathologiques divers avec des symptômes infectieux, métaboliques, immunitaires ou même neuronaux.

4.1. Rôles dans le tractus gastro-intestinal

Il est aujourd'hui clairement défini que le microbiote intestinal est très fortement lié à l'état de santé de l'hôte et qu'une dysbiose peut être à l'origine de pathologies potentiellement graves. Ces maladies peuvent être de nature inflammatoire (maladie de Crohn, la rectocolite hémorragique ou le syndrome de l'intestin irritable), cancéreuse (cancer colorectal), immunologique et métabolique (allergie, diabète) ou fonctionnelle (obésité) (Tableau 3). Le syndrome de l'intestin irritable (*Irritable Bowel Syndrome* IBS), également connu sous le nom de colopathie fonctionnelle est une pathologie avec une grande prévalence, mais sans gravité. Néanmoins, celle-ci a un impact fortement négatif sur la qualité de vie des patients. Cette pathologie est associée à des douleurs abdominales, un inconfort et des troubles du transit

Tableau 3 : Pathologies et troubles fonctionnels associés à des dysbioses du microbiote intestinal

Adapté et traduit depuis de De Vos and De Vos 2012

Pathologies	**Observations les plus pertinentes et corrélations potentielles**
Maladie de Crohn	Diminution de la diversité du microbiote Réduction de *F. prausnitzii*
Rectocolite hémorragique	Diminution de la diversité du microbiote Réduction d'*Akkermansia muciniphila*
Syndrome de l'intestin irritable	Augmentation de *Dorea* et de *Ruminococcus*
Infection à *Clostridium difficile*	Forte diminution de la diversité du microbiote Présence de *Clostridium difficile*
Cancer colorectal	Variation des *Bacteroides* Augmentation des *Fusobacteria*
Allergie / atopie	Diversité altérée Signatures microbiennes spécifiques
Maladie cœliaque	Composition altérée particulièrement dans l'intestin grêle
Diabète de type 1	Signature microbienne particulière
Diabète de type 2	Signature microbienne particulière
Obésité	Rapport *Bacteroidetes* / *Firmicutes* spécifique

digestif (constipation, diarrhée ou alternance des deux) (World Gastroenterology Organisation 2015). Le traitement médicamenteux conventionnel est très souvent un échec amenant les patients à utiliser des traitements alternatifs comme l'utilisation des probiotiques (Dapoigny *et al.* 2012). Dans le cas de la maladie de Crohn et de la rectocolite hémorragique, bien qu'une prédisposition génétique existe chez les patients, une diminution de la diversité microbienne a été observée avec des différences entre les maladies. En effet, il existe une forte baisse de la présence de *F. prausnitzii* en cas de maladie de Crohn et d'*A. muciniphila* lors d'une rectocolite hémorragique. Ces deux bactéries semblent jouer un rôle très important dans la flore commensale en ayant respectivement des propriétés anti-inflammatoires (Sokol *et al.* 2008) et en stimulant le système immunitaire (Derrien *et al.* 2011).

Une variation de la composition du microbiote a aussi été observée lors de cancers colorectaux, notamment à proximité des sites tumoraux. Le genre *Fusobacterium* surreprésenté peut envahir les entérocytes, une variation des *Bacteroides* ainsi qu'une réduction d'*A. muciniphila*, sont également constatées comme dans le cas des maladies inflammatoires (Sobhani *et al.* 2011 ; Castellarin *et al.* 2012 ; Kostic *et al.* 2012). Enfin, des études chez la souris ont montré un lien de cause à effet évident entre le microbiote et le diabète de type II (DT2), impliquant le récepteur 5 de type Toll (Vijay-Kumar *et al.* 2010). La relation entre le DT2 et le microbiote a été étudiée et des marqueurs clés ont été identifiés même si les résultats sont contradictoires. Un symptôme commun est une inflammation chronique qui, *in vivo*, a été associée à des taux élevés de lipopolysaccharides et à un microbiote à la composition anormale (diminution de *Bifidobacterium spp.*, du groupe *Eubacterium rectale – Clostridum coccoides* et des *Bacteroides*) (Cani *et al.* 2007).

4.2. Rôles des probiotiques dans le maintien de l'équilibre de la flore vaginale

Dans les domaines obstétrique et gynécologique, les probiotiques, administrés par voie orale ou vaginale, ont été principalement testés pour la prévention et le traitement des infections vaginales et pour éviter des naissances prématurées (H. Tan *et al.* 2017 ; Jarde *et al.* 2018 ; Kirihara *et al.* 2018). L'utilisation de probiotiques oraux dans le traitement des affections gynécologiques est liée à la capacité de ces microorganismes à survivre dans le système gastro-intestinal et à remonter dans le tractus vaginal après leur excrétion du rectum. L'administration vaginale permet une action plus directe et ciblée des probiotiques pour restaurer le microbiote vaginal (Homayouni *et al.* 2014).

Les infections vaginales représentent l'un des motifs les plus courants de consultation gynécologique (Xie *et al.* 2017). On estime qu'environ sept femmes sur dix connaîtront au moins un épisode de candidose vulvo-vaginale (CVV) dans leur vie (Sobel 2007). La vaginose bactérienne (BV) est un autre trouble vaginal hautement prévalant associé à un risque accru de maladie inflammatoire pelvienne, d'infection sexuellement transmissible, de transmission du VIH et d'accouchement prématuré (Ma *et al.* 2017). Une BV préexistante semble être fortement associée à ce phénomène (Kirihara *et al.* 2018). Elle est caractérisée par une réduction ou une diminution de la présence des lactobacilles et une prolifération excessive de *G. vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, des espèces de *Prevotella* et d'autres bactéries anaérobies pathogènes (Sobel 2007). Les espèces de lactobacilles produisent de l'acide lactique et acétique, maintenant le pH vaginal inférieur ou égal à 4,5 et du peroxyde d'hydrogène, ce qui entrave la croissance des bactéries pathogènes et de *C. albicans* (le pH n'a pas d'action inhibitrice sur *Candida*). C'est pourquoi elles sont donc considérées comme protectrices contre la CVV et la BV (Reid *et al.* 2011 ; Ma *et al.* 2017). En conséquence, l'effet bénéfique supposé des probiotiques contenant des espèces de *Lactobacillus* sur la restauration et le maintien du microbiote vaginal physiologique a favorisé leur utilisation pour le traitement de ces deux troubles.

Les mécanismes supposés incluent la production de cytokines anti-inflammatoires et la réduction du pH vaginal, de sorte que cet environnement redevient propice à la croissance de bactéries inoffensives (Reid and Bocking 2003 ; Reid *et al.* 2011).

4.3. Applications thérapeutiques de Lcr35®

4.3.1. Applications intestinales

Parmi les premières études cliniques avec Lcr35® dans un contexte intestinal figurent les travaux de De Champs *et al.* (2003). Ceux-ci avaient pour but l'évaluation de la capacité du probiotique à survivre et à persister dans le tractus gastro-intestinal de l'homme après une administration orale. Entre 10^8 et 10^{12} UFC.g^{-1} de Lcr35® ont été administrés chaque jour pendant une semaine, cette posologie étant répétée de la même manière trois semaines plus tard. À l'issue de l'essai clinique, les auteurs ont montré une augmentation du nombre de lactobacilli au cours de la première semaine de traitement et que cet effet se maintenait au cours du temps. Cela traduit la résistance et la persistance de Lcr35® dans l'intestin.

Une récente étude clinique s'est intéressée à l'utilisation du Lcr35® dans le traitement du syndrome de l'intestin irritable (IBS) (Dapoigny *et al.* 2012). Les auteurs indiquent que Lcr35® pourrait être un traitement efficace pour traiter l'IBS, notamment chez les patients

souffrant de diarrhées. En effet, il semble que la présence du probiotique dans le tractus digestif entraîne une diminution des symptômes et notamment de la douleur. Cependant, cette étude nécessite d'être confirmée sur une population plus large. D'autres travaux ont démontré les propriétés anti-inflammatoires du probiotique formulé industriellement dans des modèles rats hypersensibles. Les auteurs ont mis en évidence une plus grande résistance des rats à la douleur après un traitement probiotique. Un effet immunomodulateur a par ailleurs été observé avec la régulation de la sécrétion d'interleukine-23 (IL-23) et l'activation des lymphocytes Th17 (Darbaky *et al.* 2016).

De plus, des essais portant sur des enfants souffrant de constipation chronique ont été mis en place. Ceux-ci visaient à comparer le traitement utilisé traditionnellement à base d'oxyde de magnésium (MgO) avec l'administration de probiotique. Dans les deux cas, une amélioration significative du transit intestinal a été observée par rapport au placebo. Cependant, aucune différence n'a été constaté entre le groupe traité au MgO et celui avec Lcr35® à l'exception d'une diminution de la douleur dans ce dernier cas (Bu *et al.* 2007).

Récemment, des auteurs se sont intéressés à l'utilisation de Lcr35® dans le cas d'une chimiothérapie anti-cancéreuse à base de FOLFOX (oxaliplatine et 5— fluorouracile) (C.-W. Chang *et al.* 2018). Ce médicament, recommandé pour le traitement du carcinome colorectal, provoque, comme effet indésirable, l'inflammation des muqueuses du tractus digestif avec pour conséquence une forte diminution de la qualité de vie du patient. Les auteurs ont montré que l'administration lors de la chimiothérapie permettait une réduction significative des symptômes liés aux effets indésirables sans entraver l'effet antitumoral du FOLFOX. Aussi, le FOLFOX entraîne habituellement une diminution de la quantité de *Firmicutes* et *Bacteroidetes* dans les fécès. En présence de Lcr35®, cet effet est significativement inhibé.

4.3.2. Applications vaginales

En plus des propriétés antipathogènes observées dans un contexte de dysbiose intestinale, Lcr35® a également des applications thérapeutiques ciblant les infections des voies génitales féminines. Plusieurs essais cliniques ont démontré les effets bénéfiques de la souche Lcr35® chez les femmes.

Une première étude porte sur la restauration du microbiote après une antibiothérapie dans un contexte de vaginose bactérienne (BV) (Petricevic and Witt 2008). La BV est une pathologie difficile à diagnostiquer, notamment en raison du fait qu'elle peut être associée à la présence simultannée de plusieurs pathogènes. Le métronidazole et la clindamycine se sont révélés être des traitements efficaces contre la BV tout en favorisant la recolonisation des lactobacilles vaginaux (Nyirjesy *et al.* 2006 ; Ling *et al.* 2013). Bien qu'un traitement anti-

infectieux soit disponible et généralement efficace pour éradiquer les microorganismes pathogènes, son utilisation à long terme est souvent limitée par les rechutes, qui sont très probablement dues à une incapacité à rétablir la flore vaginale normale dominée par les *Lactobacillus* suite au traitement (Simoes *et al.* 2001 ; Beigi *et al.* 2004 ; Nyirjesy *et al.* 2006). À l'issue de l'essai clinique, les auteurs ont mis en évidence que l'administration exogène de *Lactobacillus* vivant, à savoir Lcr35® (1 capsule vaginale contenant au moins 10^9 UFC pour 7 jours), permet une restauration du microbiote vaginal. Ce résultat a été observé chez 83 % des patientes traitées. Les auteurs ont émis l'hypothèse que Lcr35® permet tout d'abord l'élimination du ou des pathogènes grâce à la sécrétion de molécules antimicrobiennes comme la lactocine 160 (Li *et al.* 2005). Dans un second temps, le probiotique en fermentant le glycogène en acide lactique, assurerait une restauration des paramètres physiologiques normaux de la muqueuse vaginale propices à la recolonisation par la flore commensale (Petricevic and Witt 2008).

Une seconde étude portait sur l'impact au niveau vaginal de l'administration orale de la souche lyophilisée. Celle-ci a été réalisée uniquement chez des femmes en bonne santé (Bohbot and Cardot 2012). Cet essai clinique a démontré de manière formelle l'impact positif d'une prise orale de Lcr35® sur le microbiote vaginal présentant une BV asymptomatique. En effet, la bactérie est capable de résister et de survivre au passage dans le tractus digestif avant d'aller s'implanter, au moins temporairement dans le tractus vaginal. Celle-ci a pu être quantifiée 28 jours après administration orale. Les auteurs ont également souligné qu'avec une dose de $2\,10^8$ UFC.jour^{-1}, Lcr35® a la capacité de coloniser la sphère vaginale après une administration orale. Ils préconisent de nouveaux essais cliniques pour démontrer les effets préventifs et curatifs d'une telle administration.

Enfin, une troisième étude consiste en un traitement préventif de la candidose vulvo-vaginale récidivante (CVVR) (Kern *et al.* 2012). Cette étude clinique présente un grand intérêt thérapeutique pour les femmes. En effet, une CVVR est très souvent d'origine multifactorielle rendant son traitement complexe. D'une manière conventionnelle, les soins se composent d'un traitement antifongique qui doit être suivi pendant au moins 6 mois. Néanmoins, le taux de récidive est très important et touche 60 à 70 % des femmes dans les deux mois suivant l'arrêt du traitement (Sobel 2003). Il a été également montré que les antifongiques ont des effets indésirables pouvant causer à long terme une vaginose bactérienne (VB) (Martinez *et al.* 2009). Dans le cas présent, les patientes ayant été traitées par Gynophilus® (souche formulée de Lcr35®) voient leur taux de récidive fortement diminuer (71,1 à 43,4 %) par rapport aux patientes non traitées. De plus, le probiotique permet également une amélioration significative de la symptomatologie chez les patientes avec, par conséquent, une amélioration de la qualité

de vie, le tout associé à une très bonne acceptation du traitement. Les auteurs concluent l'étude clinique en soulignant l'importance d'un traitement probiotique pour la prévention de CVV et par conséquent leur récidive. Cela est valable aussi bien chez les patientes répondant mal aux traitements conventionnels que pour celles qui se tournent vers des alternatives « plus naturelles » (Kern *et al.* 2012).

5. Conclusion

Les souches microbiennes sélectionnées pour leur potentiel probiotique après différentes étapes de criblage sur des modèles *in vitro*, sont finalement testées en situation réelle *in vivo*, à savoir chez des personnes volontaires saines et des patients souffrants de diverses maladies. Bien qu'extrêmement utiles pour s'assurer de l'efficacité des souches, ces essais cliniques ont aussi de très grandes limitations. En effet, au-delà du coût très important qu'ils représentent et des questions d'éthique qu'ils soulèvent, l'obtention des cohortes de patients les plus représentatives, leurs suivis au cours des expérimentations et la répétabilité des résultats sont des paramètres extrêmement difficiles à maîtriser. De plus, pour des raisons évidentes, le recours à l'expérimentation sur l'Homme, sauf dans de rares cas, ne permet pas d'avoir accès aux données mécanistiques permettant une compréhension des modes d'actions des probiotiques. De ce fait, il conviendra de mettre en place d'autres méthodes d'analyse, utilisant des modèles *in vivo* dont le choix sera dicté par plusieurs critères : objectifs des expérimentations, pertinence du modèle, questions d'éthiques, coûts, etc.

Chapitre 3.

Caractérisation des mécanismes d'action de microorganismes d'intérêt par des approches *in vivo*

1. Introduction

La sélection de nouvelles souches microbiennes à potentiel probiotique de même que la caractérisation de leurs propriétés ont été pendant très longtemps basées sur des expérimentations utilisant des modèles *in vitro* (cultures cellulaires). Ceux-ci présentent un avantage indéniable : un contrôle strict des conditions expérimentales (ex : nature des milieux de culture, quantité de microorganismes, température, pH, etc.) ainsi que des interactions entre microorganismes limitées, le plus souvent avec des modèles binaires. Ceci permet de faciliter l'analyse et l'interprétation des effets observés. De plus, la recherche concernant les microorganismes probiotiques fait face à de nouveaux défis avec une pression réglementaire de plus en plus grandissante émanant de l'Union européenne et des États-Unis d'Amérique. Ces verrous réglementaires imposent aux laboratoires pharmaceutiques fabriquant des probiotiques et par conséquent aux équipes de recherche, l'utilisation de méthodes et de modèles pertinents pour étudier leur souche, notamment en associant des approches *in vitro* et *in vivo*. Ce n'est qu'avec cette caractérisation plus fine que les laboratoires pourront justifier plus fermement de l'intérêt d'utiliser leurs produits pour des applications en santé (Papadimitriou *et al.* 2015). Néanmoins, de la même manière que pour les modèles *in vitro*, selon le contexte scientifique (historique) et l'objectif à atteindre, il conviendra de s'orienter vers un modèle animal en particulier plutôt qu'un autre avant l'étude finale indispensable qui est de réaliser des essais cliniques chez l'Homme (Douglas 2018).

Une partie de ce chapitre et du suivant ont fait l'objet d'un article de revue qui a été soumis à Frontiers in Nutrition (Annexe 1).

Tableau 4 : Les modèles animaux traditionnels dans la recherche sur le microbiome.

Adapté de Douglas (2018)

Modèle animal	Animaux axéniques	Compatibilité avec les microorganismes d'origine humaine
Mus musculus	Techniquement exigeant et coûteux à produire et à entretenir	Oui
Danio rerio	Techniquement simple jusqu'à 6 à 8 jours	Taxons aérotolérants, anaérobies non obligatoires
Drosophila melanogaster	Techniquement simple et rentable	
Caenorhabditis elegans		

Tableau 5 : Caractéristiques comparatives des hôtes utilisés dans les études sur les interactions hôte-pathogène.

Adapté de Nathan (2014)

	Mus musculus	***Caenorhabditis elegans***	***Drosophila melanogaster***	***Galleria mellonella***	***Danio rerio***
Traçabilité génétique (génétique classique / inverse)	Non	Oui	Oui	Non	Oui
Disponibilité de souches mutantes	Oui	Oui	Oui	Non	Oui
Agent infectieux					
- Bactérie	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
- Virus	Oui	Variable	Oui	Non	Oui
- Parasite	Oui	Non	Oui	Non	Oui
- Champignon	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Inoculation	Injection	Nourriture	Injection	Injection	Nourriture
Survie à 37 °C	Oui	Non	Non	Oui	Non
Facilité d'utilisation	Non	Oui	Oui	Oui	Oui
Coûts des ressources et infrastructures	Elevés	Elevés	Faibles	Faibles	Elevés
Existence de banque d'ARNi	Non	Oui	Oui	Non	Non
Exigences d'éthique	Oui	Non	Non	Non	Non
Réalisation de criblages à haut débit	Non	Oui	Variable	Non	Oui
Biopuces disponibles	Oui	Oui	Oui	Non	Oui
Génome séquencé	Oui	Oui	Oui	Non	Oui
Corrélation des facteurs de virulences avec les mammifères	Oui	Variable	Oui	Oui	Oui
Immunité adaptative	Oui	Non	Non	Non	Oui
Adapté au criblage d'antibiotiques / anti-infectieux / antimicrobiens	Non	Oui	Oui	Oui	Oui

2. Comparaison des modèles *in vivo*

La mise en œuvre de techniques *in vivo* pour explorer le monde des probiotiques a permis la description d'une importante diversité de modèles avec des complexités très variées. Ceux-ci peuvent être aussi simples que des organismes multicellulaires comme des vers, des mouches (invertébrés) tout comme être particulièrement sophistiqués comme des souris *knock-out* ou des hommes (essais cliniques) (Tableau 4). Tous ces modèles apportent à la communauté scientifique une très grande quantité d'informations, mais ils ont aussi certains inconvénients. Par conséquent, il est primordial de choisir avec discernement et rigueur le modèle qui sera le plus adapté à la question scientifique en se basant sur des aspects techniques, éthiques, économiques et en fonction contexte scientifique (Tableau 5). Dès lors, alors que la caractérisation et l'évaluation des propriétés d'une souche probiotique devraient être réalisées directement au sein de la population cible, une présélection des souches est indispensable avant de la tester à l'aide de modèles *in vivo* appropriés (Rijkers *et al.* 2010 ; Papadimitriou *et al.* 2015).

2.1. Les modèles vertébrés

La communauté scientifique dispose aujourd'hui de modèles animaux vertébrés permettant des investigations dans la plupart des domaines de la biologie. Les plus connus sont le rat (*Rattus norvegicus*), la souris (*Mus musculus*), le cochon d'Inde (*Cavia porcellus*), le macaque (*Macaca mulatta*), le chat (*Felis sylvestris catus*) ou le chien (*Canis lupus familiaris*) pour ne citer qu'eux. Cependant, parmi cette multitude et en raison de leurs similitudes avec l'Homme, seuls quelques modèles sont couramment utilisés en laboratoire, principalement à cause de contraintes réglementaires et d'éthiques, de la complexité d'utilisation, mais également du coût particulièrement élevé qu'ils peuvent représenter. Seuls la souris, le rat et le poisson-zèbre seront présentés par la suite.

2.1.1. La souris *Mus musculus*

La souris de laboratoire *M. musculus* a été très largement utilisée comme un outil pour décrypter le rôle du microbiote intestinal dans la physiologie des mammifères comme le développement du cerveau et le comportement (Heijtz *et al.* 2011 ; Ezenwa *et al.* 2012), l'obésité et la malnutrition (Turnbaugh and Gordon 2009 ; Smith *et al.* 2013), la fonction hépatique (Dapito *et al.* 2012), la physiologie intestinale (Swanson *et al.* 2011) et la réponse immunitaire (Hooper *et al.* 2012). Environ 99 % des gènes de la souris sont partagés avec l'Homme et les deux organismes partagent d'importantes similarités dans le microbiome,

notamment au niveau des phyla (*Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*). Cela en fait un modèle puissant pour l'évaluation des interactions hôte – microbiote, en lien avec la biologie humaine (Spor *et al.* 2011). De nombreux outils génétiques sont à disposition de la communauté scientifique : de nombreuses souches consanguines ou non, une collection de mutants *knock-out*, *knock-in* et transgéniques, la possibilité de réaliser de l'ARN interférence *in vivo*, la mutagenèse, etc. Ces éléments font de la souris un très bon modèle pour étudier les interactions hôte-microbiote à un niveau génétique. D'autres utilisations de la souris, notamment dans le domaine de l'immunité, sont présentées dans le Tableau 6. Cependant, des limitations expérimentales existent. La peau, la fourrure et les structures oropharyngées, la compartimentation du tube digestif et le comportement (tel que la coprophagie) sont différents de ceux de l'homme et peuvent avoir une grande influence sur les communautés microbiennes et par conséquent leur impact sur l'hôte (Kostic *et al.* 2013).

Aussi, le modèle souris n'est pas toujours recommandé et peut même être proscrit. En effet, l'utilisation de souris contenant des microorganismes d'origine humaine est particulièrement problématique. Une proportion non négligeable de ces microorganismes sont incapables de coloniser l'intestin murin et les taxons qui le colonisent n'induisent pas certaines réponses habituellement observées en présence du microbiote natif (Chung *et al.* 2012 ; Arrieta *et al.* 2016). Cette limitation peut s'expliquer de deux manières différentes. Dans un premier temps, il convient de noter que les relations symbiotiques entre l'Homme (ou un hôte) et son microbiote sont le fruit d'une longue histoire évolutive. De nombreuses interactions ont eu lieu entre les deux protagonistes induisant des adaptations aussi bien chez l'un que chez l'autre (McFall-Ngai *et al.* 2013). Aussi, dans un second temps, des auteurs ont montré une rapide progression de nouveaux modèles dits « *ex vivo* » qui consiste à cultiver des cellules humaines sous forme d'organoïdes ou de « feuilles » d'épithélium (Shah *et al.* 2016 ; Hill and Spence 2017).

2.1.2. Le rat *Rattus norvegicus*

En dépit du fait qu'il soit moins utilisé que la souris, le rat est la seconde espèce de rongeur utilisée dans la recherche. Plus proche physiologiquement de l'Homme que ne l'est la souris, le rat permet l'obtention de résultats expérimentaux plus facilement transposables et extrapolables à l'Homme (Lee *et al.* 2018). Il constitue ainsi un très bon modèle d'étude préclinique (Hardin-Pouzet and Morosan 2019). Au-delà des proximités génétique, histologique et physiologique avec l'Homme et comme pour la souris, le microbiote intestinal du rat est dominé par trois grands phyla : les *Firmicutes* (78,7 %), les *Bacteroidetes* (9,1 %) et les *Proteobacteria* (6,6 %) (Li *et al.* 2017). D'un point de vue expérimental, l'animal a été utilisé

Tableau 6 : Avantages de l'utilisation de modèles de petits animaux / rongeurs pour la recherche sur les probiotiques

(Papadimitriou *et al.* 2015)

Functionality	Possible intervention/improvement	Representative references
Physiological relevance for humans (Immune system, neuroendocrinological system)	Transgenic mice (knock-out/ knock-in)	Helm and Burks (2002)
Closely related innate and adaptive immunity (PRRs and signaling cascades, secretory Ig, T and B cells, DCs, etc.)	Tissue-specific knock-out	Sodhi *et al.* (2012)
Sharing of similar immune response types (Th1, Th2, Th17, Treg cells and cytokine responses)	Conditional knock-out	Sodhi *et al.* (2012)
Hosting complex microbiota (gut, vagina, lung, skin)	Humanized mice	Martin *et al.* (2008)
	Axenic mice	Verdu and Collins (2004)
	Monocolonized mice	Eaton *et al.* (2011)
	Microbiota transplantation	Le Roy *et al.* (2013)
	Co-housing	Henao-Mejia *et al.* (2012)
	Selective antibiotic treatment	Ichinohe *et al.* (2011), Viaud *et al.* (2013)
Responsiveness to many infectious, immune and other disorders	Allergy, inflammation (asthma, COPD, IBD, etc.)	Kim *et al.* (2014)
	Bacteria, virus, fungi and parasites pathogens	Alak *et al.* (1997), Villena *et al.* (2011), Collins *et al.* (2014), Kikuchi *et al.* (2014)
	Neurologic disorders (EAE, visceral pain)	Eutamene *et al.* (2007), Rousseaux *et al.* (2007), Kwon *et al.* (2013)
	Stress, cognitive functions	Gilbert *et al.* (2013), Hsiao *et al.* (2013)

pour étudier l'impact de bactéries à potentiel probiotique au niveau intestinal, dans le cas de syndromes inflammatoires, notamment en lien avec l'obésité (Duncker *et al.* 2011 ; Plaza-Díaz *et al.* 2017 ; Fukui *et al.* 2018 ; Mazloom *et al.* 2019).

Cependant, le développement du modèle rat a jusqu'à récemment été ralenti par le manque de mutants disponibles, les premiers n'étant générés par des outils d'édition du génome qu'en 2010 (Tong *et al.* 2010). Depuis, différentes méthodes de transgénèse (ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9) ont été appliquées avec succès ce qui devrait accélérer le développement de mutants (Li *et al.* 2013).

2.1.3. Le poisson-zèbre *Danio rerio*

Le poisson-zèbre *D. rerio*, avec son microbiote varié, mais toujours parmi les modèles de vertébrés les plus simples, est en train de devenir un modèle puissant pour étudier la complexité des interactions hôte-microbiote. Le poisson-zèbre a un certain nombre de caractéristiques qui en font un système expérimental attrayant. Celles-ci incluent la fécondation externe et la transparence des embryons et des larves qui permettent la visualisation des cellules en développement ainsi que la colonisation des microorganismes par microscopie confocale. Le développement rapide des primordia d'organes (moins de 5 jours après la fécondation [jaf]) et le début de la métamorphose chez l'adulte (moins de 14 jaf), ainsi que leur petite taille, font du poisson-zèbre un outil intéressant pour des études mécanistiques. Il existe un degré élevé d'homologie entre le poisson-zèbre et les mammifères, non seulement dans le système immunitaire adaptatif, mais également dans le système digestif. Le poisson-zèbre possède un pancréas, une vésicule biliaire, un foie et un intestin. En outre, les cellules de l'épithélium intestinal comprennent des entérocytes absorbants, des cellules caliciformes et des cellules entéroendocrines similaires aux mammifères (Kostic *et al.* 2013). D'un point de vue immunologique, *D. rerio* détecte les microorganismes en détectant les structures moléculaires associées aux microbes (MAMP), principalement par l'utilisation de récepteurs TLR et de type NOD (*nucleotide oligomerization domain*).

Les limites du modèle du poisson-zèbre dans la recherche sur le microbiote incluent les différences dans les conditions environnementales par rapport aux humains et aux autres organismes modèles (Ericsson 2019). Le microbiote intestinal du poisson-zèbre est donc différent de celui des hôtes mammifères et, contrairement à la plupart des autres espèces hôtes, il varie considérablement d'un laboratoire à l'autre, notamment en fonction du régime alimentaire (Roeselers *et al.* 2011). Bien que le microbiote fécal des humains et des rongeurs puisse varier considérablement au niveau du genre en fonction de la génétique de l'hôte, de l'âge et de facteurs environnementaux, il est toujours dominé par les phyla *Firmicutes* et

Bacteroidetes. Le microbiote intestinal du poisson-zèbre est dominé par les *Proteobacteria* et les *Fusobacteria*, avec une présence variable de *Firmicutes*, de *Cyanobacteria* et d'*Actinobacteria* (Rawls *et al.* 2006 ; Roeselers *et al.* 2011) ; les *Bacteroidetes* sont généralement, mais pas toujours, négligeables (Davis *et al.* 2016).

2.1.4. Éthique et législation

La controverse sur l'expérimentation animale a toujours été forte. Les chercheurs ayant besoin de modèles animaux doivent faire face à des considérations éthiques et légales. Aussi l'opinion publique n'est souvent pas consciente de l'importance économique et sociétale de la recherche envisagée ni du contexte réglementaire qui limite également l'utilisation non éthique de souffrance animale. Les chercheurs doivent également veiller activement à ce que les modèles animaux (i) soient validés scientifiquement (et statistiquement) (ii) ne puissent pas être remplacés par des alternatives *in vitro* et (iii) minimisent les souffrances des animaux en limitant le nombre d'animaux et la durée de l'expérimentation à ce qui est statistiquement requis. Les stratégies et les méthodes de recherche doivent être constamment remises en question et examinées de manière objective par rapport à la règle des 3R établie il y a plus de 50 ans, c'est-à-dire en utilisant les possibilités de remplacement, de réduction et d'affinement (*Refinement, Reduction and Replacement*) (Russell and Burch 1959). Outre la prise en charge correcte de la douleur par l'analgésie et l'anesthésie, les aménagements de bien-être se sont considérablement améliorés conformément aux dernières directives américaines et européennes en matière d'hébergement des animaux. Les souris et les rats doivent disposer d'un espace suffisant, d'une complexité suffisante, permettant d'exprimer une large gamme de comportements normaux et offrant des possibilités d'enrichissement permettant de promouvoir l'exercice physique, la recherche de nourriture, la manipulation et les activités cognitives (Richmond 2000 ; Papadimitriou *et al.* 2015).

Bien entendu, il existe d'autres modèles animaux tels que le cochon, le chien ou le singe. Cependant, leur utilisation est assez marginale et est surtout restreinte à des domaines bien précis. De plus, leur mise en œuvre nécessite de prendre en compte des considérations éthiques considérables (Papadimitriou *et al.* 2015).

2.2. Les modèles invertébrés

2.2.1. La mouche *Drosophila melanogaster*

D. melanogaster se distingue comme un excellent organisme modèle pouvant permettre une validation fiable des effets probiotiques sur un organisme vivant : capacités de

criblage à haut débit, reproduction peu coûteuse et rapide et microbiome facile à manipuler. En outre, de nombreux outils pour étudier les relations hôte-microbe chez *D. melanogaster* sont déjà disponibles en raison de sa riche histoire en matière de recherche sur les agents pathogènes (Lemaitre and Hoffmann 2007). Comparé au tractus gastro-intestinal des mammifères, l'intestin de *D. melanogaster* présente plusieurs différences majeures, mais la structure et la fonction globales sont similaires. La physiologie gastro-intestinale, l'anatomie et les voies de signalisation contrôlant le développement, la régénération et la pathologie de l'intestin sont hautement conservées chez *D. melanogaster* (Apidianakis and Rahme 2011). D'autres ont déjà évoqué l'idée d'utiliser *D. melanogaster* pour étudier la modulation symbiotique de la physiologie de l'hôte (Erkosar *et al.* 2013 ; D. Ma *et al.* 2015). Cependant, l'utilisation du modèle *D. melanogaster* pour la recherche sur le microbiote n'a pas encore été largement mise en œuvre. Une large gamme de souches de *D. melanogaster* disponibles dans les banques publiques peut être dérivée sans germes et maintenue facilement sans nécessiter d'installations coûteuses pour animaux, d'équipements et de techniciens (Koyle *et al.* 2016). Comparé au microbiote de souris ou humain, le microbiote de *D. melanogaster* présente une faible diversité microbienne (1 à 30 espèces) et est généralement dominé par *Lactobacillus* et *Acetobacter* (Blum *et al.* 2013 ; Erkosar *et al.* 2013 ; Chaston *et al.* 2014). L'expérimentation chez *D. melanogaster* est abordable, pratique et nécessite rarement l'approbation des comités d'éthique. Ces caractéristiques font de *D. melanogaster* un modèle *in vivo* idéal à haut débit pour la compréhension des interactions hôte-microbiote (Trinder *et al.* 2017), notamment pour le criblage de bactéries à potentiel probiotique (Gómez *et al.* 2019). En revanche, il existe des points faibles limitant l'utilisation de la mouche comme modèle. En effet, l'infection de l'animal par une souche microbienne est réalisée par injection directe ce qui contourne les mécanismes mis en place lors des premières étapes d'une infection. Ceci est alors une source de biais, notamment pour l'étude d'infection à *Listeria monocytogenes* (Jensen *et al.* 2007). De plus, même s'il est possible de réaliser des expérimentations à haut débit avec cet animal, leur mise en œuvre reste encore délicate.

2.2.2. La fausse teigne *Galleria mellonella*

Un nouveau modèle d'invertébré commence à émerger : la fausse teigne *G. mellonella.* Alors qu'elle n'est pas (encore) aussi génétiquement modifiable que *D. melanogaster* ou *C. elegans*, la simplicité de manipulation et d'infection des larves de *G. mellonella* combinées à leur survie à 25 et à 37 °C font de la teigne un modèle prometteur (Nathan 2014). En particulier dans la recherche sur la pathogenèse bactérienne (Ramarao *et al.* 2012 ; Mukherjee *et al.* 2013) et fongique (Fuchs *et al.* 2010 ; Fallon *et al.* 2012), les larves de *G. mellonella* se sont révélées très pertinentes en tant que modèle d'infection. Dans leur étude, Vilela *et al.* utilisé

les larves comme modèle d'infection par la levure pathogène *C. albicans* et de co-infection par une souche bénéfique de *Lactobacillus acidophilus* (Vilela *et al.* 2015). La candidose expérimentale est bien établie chez *G. mellonella* (Junqueira 2012 ; Gago *et al.* 2014) et une tentative visant à empêcher l'issue létale de l'infection fongique par l'administration de probiotiques constitue une approche envisageable pour tester l'interférence des probiotiques avec la pathogénicité de *C. albicans*.

Les larves de fausses teignes présentent des avantages évidents, tels que la facilité d'utilisation et des coûts réduits, notamment par rapport aux modèles de vertébrés (Nathan 2014). Contrairement à *D. melanogaster* et *C. elegans*, les infections fongiques ou bactériennes et les mécanismes de défense immunitaire de l'hôte chez *G. mellonella* semblent être très proches de ceux rencontrés chez l'Homme (Nathan 2014). Inversement, l'absence de séquence complète du génome, l'absence de souches mutantes et le besoin de standardisation entre différentes sources et laboratoires (Mukherjee *et al.* 2013 ; Nathan 2014), freinent actuellement l'engouement pour ce modèle.

2.2.3. Le nématode *Caenorhabditis elegans*

La force de *C. elegans* en tant qu'organisme modèle pour la recherche sur le microbiome réside dans sa capacité à mener des expériences à haut débit avec un organisme gnotobiotique et à explorer la relation de cause à effet complexe entre la présence ou l'absence d'une espèce microbienne et un phénotype traduisant un bon ou un mauvais état de santé. En effet, les microorganismes qui passent à travers le pharynx jusqu'à l'intestin représentent l'unique source nutritive pour les nématodes. Ils peuvent ainsi influencer la physiologie de l'animal grâce à leurs métabolites (Jiang and Wang 2018). De plus, l'utilisation de nématodes pour le criblage de probiotiques est favorisée par la possibilité de surveiller facilement les marqueurs anti-âge, ainsi que le stockage de la graisse corporelle (Park *et al.* 2014 ; Lee *et al.* 2015). De plus, plusieurs gènes impliqués dans la réponse au stress et liés à l'immunité sont hautement conservés entre l'homme et les nématodes (Schifano *et al.* 2019).

De nos jours, l'intérêt croissant pour les effets sur la longévité dus aux probiotiques a conduit à la nécessité de modèles *in vivo* pratiques pour comprendre les mécanismes de l'activité probiotique. Ces dernières années, le nématode *C. elegans* est devenu un puissant modèle animal pour étudier les interactions hôte-probiotiques. Ses avantages incluent la facilité de manipulation, la transparence du corps, la courte durée de vie et l'absence de problèmes éthiques. Un autre outil important de *C. elegans* est la disponibilité d'animaux transgéniques. Un grand nombre de mutants, disponibles dans des banques, peut aider à étudier le mécanisme d'action au niveau moléculaire d'un composé ou de voies impliquées

dans l'interaction hôte-microorganisme. Par exemple, dans un contexte infectieux, l'utilisation de nématodes transgéniques GFP permet d'étudier la réponse *in vivo* par analyse de fluorescence (Chalfie *et al.* 1994 ; Jeon and Cha 2016).

À la vue de l'ensemble des éléments présentés précédemment, *D. melanogaster* et *C. elegans* semblent être les modèles les plus adaptés pour les travaux engagés dans le cadre de cette thèse. Le nématode *C. elegans* ayant été retenu pour l'étude des mécanismes d'action du probiotique Lcr35® dans un contexte de candidose, celui-ci sera décrit plus en détail dans le chapitre suivant.

Chapitre 4.

Focus sur *Caenorhabditis elegans*

1. Historique et généralités

C. elegans est un ver rond non segmenté, mesurant à l'âge adulte environ 1 millimètre de long et appartenant au phylum des *Nematoda* (nématodes). Il a été décrit pour la première fois en 1900 par le biologiste français Émile Maupas, qui le nomma *Rhabditis elegans* avant d'acquérir sa dénomination actuelle en 1952 sous l'impulsion de Osche (Riddle *et al.* 1997). L'origine étymologique du nom du ver est à la fois grecque et latine : *caeno* — (καινός ou *caenos*) signifie nouveau, récent, — *rhabditis* (ῥάβδος ou *rhabdos*) pour baguette et elegans pour élégant (Riddle *et al.* 1997 ; Meyer 2016).

À l'état naturel, cet organisme eucaryote vit dans le sol ainsi que sur les fruits en décomposition où il trouvera sa nourriture : des bactéries essentiellement (Barrière and Félix 2006). Il y a un peu plus de cinquante ans, Sydney Brenner a eu l'idée de développer le nématode *C. elegans* comme un modèle génétique pour répondre aux questions liées au développement et à la neurobiologie. Avec le temps, les recherches menées avec *C. elegans* se sont étendues à une multitude de domaines de la biologie moderne avec notamment les interactions entre cellules eucaryotes, les interactions hôtes – parasites de même que l'évolution des organismes. Il est également devenu un organisme de référence dans lequel étudier les dysfonctionnements intervenant lors de maladies humaines. En effet, *C. elegans* permet de traiter des problèmes biologiques, en utilisant la génétique directe et indirecte, à la fois au niveau de l'organisme entier et au niveau d'une cellule en particulier. C'est un système expérimental exceptionnel, notamment grâce à sa petite taille, son cycle de vie rapide, sa transparence et son génome bien annoté (Corsi *et al.* 2015). Son utilisation a permis de nombreuses découvertes scientifiques dont une sélection est indiquée dans le Tableau 7.

Depuis plus de 30 ans, au moins 4000 chercheurs du monde entier se sont tournés vers *C. elegans* dans des domaines tels que l'écotoxicologie, la neurobiologie, les maladies dégénératives, le vieillissement, les interactions hôte-microorganisme et les interactions virus-hôte récemment (Gammon 2017 ; Issi *et al.* 2017). *C. elegans*, est un nématode hermaphrodite autofécondant disposant de nombreux avantages au laboratoire. Parmi ces avantages figurent les conditions de croissance simples, un temps de génération

Tableau 7 : Sélection de découvertes dans la recherche avec *C. elegans*

Adapté de Corsi, Wightman, and Chalfie 2015

Année	Découverte	Références
1974	Identification des mutations qui affectent le comportement des animaux	Brenner 1974; Dusenberry *et al.* 1975; Hart 2006
1975	Première description des mutations affectant la thermotaxie et la mécano-transduction	Hedgecock and Russell 1975; Sulston *et al.* 1975; Chalfie and Sulston 1981; Mori and Ohshima 1995,
1977	Premier clonage et séquençage d'un gène de la myosine	Macleod *et al.* 1977
1977	Voies génétiques pour la détermination du sexe et la compensation de dosage décrites	Hodgkin and Brenner 1977; Meyer 2005; Zarkower 2006
1981	Identification des mutations affectant la sensibilité au toucher	Sulston *et al.* 1975; Chalfie and Sulston 1981
1981	Première niche de cellules souches germinales identifiée	Kimble and White 1981; Kimble and Crittenden 2005
1983	La signalisation de Notch, les présénilines, le complexe ternaire et les rôles d'inhibition latérale dans le développement décrits	Greenwald *et al.* 1983; Levitan and Greenwald 1995; Petcherski and Kimble 2000; Greenwald and Kovall 2012
1983	Première lignée complète de cellules métazoaires	Sulston and Horvitz 1977; Kimble and Hirsh 1979; Sulston *et al.* 1983
1983	Découverte des gènes de l'apoptose (mort cellulaire)	Hedgecock *et al.* 1983; Ellis and Horvitz 1986; Yuan and Horvitz 1992; Yuan *et al.* 1993; Conradt and Xue 2005
1984	Identification de gènes hétérochroniques	Ambros and Horvitz 1984; Slack and Ruvkun 1997
1986	Premier schéma de câblage complet d'un système nerveux	White *et al.* 1986; Jarrell *et al.* 2012; White 2013
1987	Découverte des premiers gènes de guidage axonal	Hedgecock *et al.* 1987, 1990; Culotti 1994
1987	Identification du rôle de la signalisation de Notch dans les blastomères embryonnaires	Priess *et al.* 1987; Priess 2005
1988	Découverte de gènes *par* dont les produits affectent la distribution asymétrique des composants cellulaires dans les embryons	Kemphues *et al.* 1988; Gönczy and Rose 2005
1988	Identification des premiers facteurs de transcription des homéodomaines LIM et POU	Way and Chalfie 1988; Finney *et al.* 1988; Hobert 2013
1990	Première description du rôle de la fonction de signalisation RAS dans le développement des métazoaires	Beitel *et al.* 1990; Han and Sternberg 1990; Sternberg 2005; Sundaram 2013

1993	Démonstration du rôle des gènes de la voie de l'insuline dans la régulation de la durée de vie	Friedman and Johnson 1988; Kenyon *et al.* 1993; Kimura *et al.* 1997; Collins *et al.* 2007
1993	Identification de gènes pour les fonctions synaptiques conservées	Gengyo-Ando *et al.* 1993; Richmond *et al.* 1999; Richmond 2007
1993	Premier microARN (*lin-4*) et sa cible ARNm (*lin-14*) décrite	Lee *et al.* 1993; Wightman *et al.* 1993 Vella and Slack 2005
1993	Identification de gènes de désintégration à médiation non-sens	Pulak and Anderson 1993; Hodgkin 2005b
1994	Introduction de la GFP en tant que marqueur biologique	Chalfie *et al.* 1994; Boulin *et al.* 2006
1994	Première démonstration d'un couple récepteur olfactif / ligand spécifique	Sengupta *et al.* 1994; Bargmann 2006
1998	Premier génome de métazoaires séquencé	*C. elegans* Sequencing Consortium 1998; Schwarz 2005
1998	Découverte d'interférence ARN (ARNi)	Fire *et al.* 1998
2000	Conservation et omniprésence des miARN	Pasquinelli *et al.* 2000
2000	Développement du criblage d'ARNi à l'échelle du génome / premier profil complet de la fonction des gènes à l'échelle du génome	Fraser *et al.* 2000; Kamath *et al.* 2001
2000	L'héritage transgénérationnel et sa médiation par les piARN	Grishok *et al.* 2000; Ashe *et al.* 2012
2002	Découverte de la première polyA polymérase cytoplasmique (*gld-2*)	Wang *et al.* 2002; Kimble and Crittenden 2005
2005	Premier profilage d'ARNi du génome complet de l'embryogenèse précoce	Sönnichsen *et al.* 2005
2005	Première utilisation de l'optogénétique channelrhodopsin chez un animal intact	Nagel *et al.* 2005
2011	Découverte des premiers virus de nématodes	Félix *et al.* 2011

court un corps transparent facilitant l'observation en microscopie à fluorescence et un faible coût d'utilisation (la génération d'un million de mutants obtenue en quelques semaines sera contenue dans 20 boîtes de Pétri à un coût équivalent à celui d'une seule souris) (Couillault and Kurz 2010). Compte tenu de l'aspect morphologique de l'animal, son intestin est un organe majeur avec un tiers de la masse somatique totale (McGhee 2007). La morphologie des cellules intestinales ainsi que les phénomènes d'endocytose et d'exocytose présentent des similitudes avec l'homme (Balla and Troemel 2013). Le génome du ver contenant 97 Mbp est entièrement séquencé (C. elegans Sequencing Consortium 1998) et contient 19 099 gènes, presque autant que le génome humain. Cette connaissance des séquences et des annotations a permis au *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC) de générer plus de 12 000 souches différentes (sauvages, mutantes), toutes génétiquement caractérisées, afin de faciliter les recherches mécanistiques utilisant le nématode (Couillault and Kurz 2010). Des gènes clés régulant de manière globale le métabolisme et l'espérance de vie de *C. elegans* tels que les gènes *daf-2* et *daf-16*, codant respectivement pour un récepteur de l'insuline et pour un facteur de transcription de Forkhead box O (FOXO), ont été identifiés. Ils sont impliqués dans l'expression de gènes codant pour des protéines chaperones, antioxydantes ou antimicrobiennes via la voie de signalisation induite par l'insuline / IGF-1 (IIS), menant tous à la modulation de l'état de santé du ver et par conséquent à sa durée de vie (Wormbase 2011, 2015 ; Sun *et al.* 2016).

Soixante-quatorze pourcents des protéines humaines ont des homologues dans l'organisme modèle *C. elegans* (*C. elegans* Sequencing Consortium 1998 ; Legouis *et al.* 1999). On trouve également plusieurs voies antimicrobiennes chez les mammifères chez les vers, ce qui suggère que c'est un modèle puissant pour explorer les mécanismes immunologiques (Marudhupandiyan *et al.* 2017 ; Zhou *et al.* 2018). Enfin, depuis le premier modèle d'infection impliquant *Pseudomonas aeruginosa* en 1999 (M. W. Tan, Mahajan-Miklos, *et al.* 1999 ; M. W. Tan, Rahme, *et al.* 1999), de nombreuses études ont mis en évidence la susceptibilité du ver à de nombreux agents pathogènes bactériens et fongiques, dont certains infectent des êtres humains tels que *P. aeruginosa* (Chelliah *et al.* 2018), *E. faecalis* (Garsin *et al.* 2001), *S. aureus, Salmonella* ou *E. coli* O157:H7 (Heo *et al.* 2018; Mi Ri Park *et al.* 2018; Sim *et al.* 2018). Compte tenu de tous ces points, *C. elegans* pourrait constituer un intermédiaire pertinent entre les modèles *in vitro* et les modèles mammifères.

2. Anatomie du nématode

2.1. Présentation générale

L'utilisation du ver en tant qu'animal modèle de laboratoire repose en grande partie sur une de ses principales caractéristiques anatomiques : son corps est transparent. De ce fait, il peut très facilement être observé à l'aide d'un microscope optique, fixé entre lame et lamelle ou sur gélose, de même qu'en microscopie à fluorescence afin d'étudier, entre autres, la répartition spatiale de l'expression de gènes d'intérêts après fusion à la GFP (*Green Fluorescent Protein*) (Couillault and Kurz 2010). Ainsi, cette transparence révèle immédiatement la structure interne du ver qui est présenté de manière simplifiée sur la Figure 10.

C. elegans de type sauvage présente deux formes sexuelles : les hermaphrodites autofécondants et les mâles (Figure 11). La gonade des hermaphrodites forme un ovotestis qui produit d'abord le sperme amiboïde haploïde qui est stocké dans la spermathèque au stade L4, puis près de l'âge adulte, la lignée germinale modifie son destin pour produire des ovocytes beaucoup plus gros. Les hermaphrodites sont essentiellement des femelles dont les gonades produisent temporairement du sperme avant de produire des ovocytes. Les hermaphrodites peuvent produire jusqu'à 300 individus qui sont fécondés par le sperme stocké. S'ils s'accouplent avec des mâles, les hermaphrodites sont capables de produire environ 1000 progénitures, ce qui indique que le sperme produit par l'hermaphrodite est un facteur limitant de l'autofécondation (Zarkower 2006). La majorité de la progéniture produite par autofécondation sont des hermaphrodites ; seulement 0,1-0,2 % de la descendance sont des mâles en raison d'une rare non-disjonction méiotique du chromosome X.

Les hermaphrodites autofécondants présentent plusieurs avantages pour l'analyse génétique. Premièrement, l'autofécondation (souvent appelée auto-fertilisation) simplifie le maintien des stocks, car un seul animal peut donner naissance à une population clonale. Deuxièmement, comme Sydney Brenner (1974) l'a écrit, « les animaux sont conduits à l'homozygotie », c'est-à-dire que les populations d'hermaphrodites ont tendance à perdre des hétérozygotes. Ainsi, les souches qui sont mutées sont essentiellement isogéniques.

Les mâles sont importants, car ils permettent l'échange du matériel génétique nécessaire pour générer des animaux de différentes compositions génétiques et cartographier les gènes. En effet, l'animal a évolué pour tirer parti de l'apport génétique de mâles rares en utilisant du sperme mâle (hors croisement) avant d'utiliser du sperme hermaphrodite (auto).

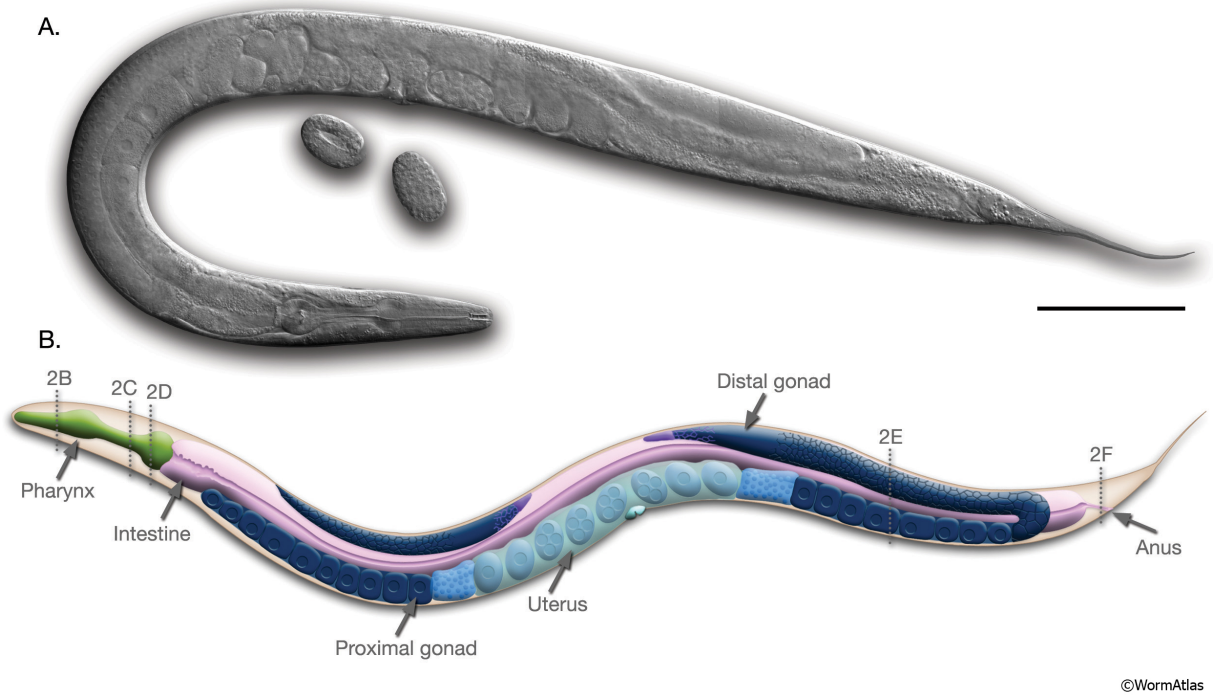


Figure 10 : Anatomie générale d'un ver adulte hermaphrodite

A. Microscopie à contraste interférentiel d'un adulte hermaphrodite, vue du côté gauche. L'échelle correspond à 0,1 mm. B. Représentation schématique des principales structures anatomiques du ver. Les indications 2B à 2F correspondent à des coupes réalisées aux endroits indiqués et disponibles sur le site internet (voir source). Traduit et adapté depuis WormAtlas© (Lints and Hall 2009)

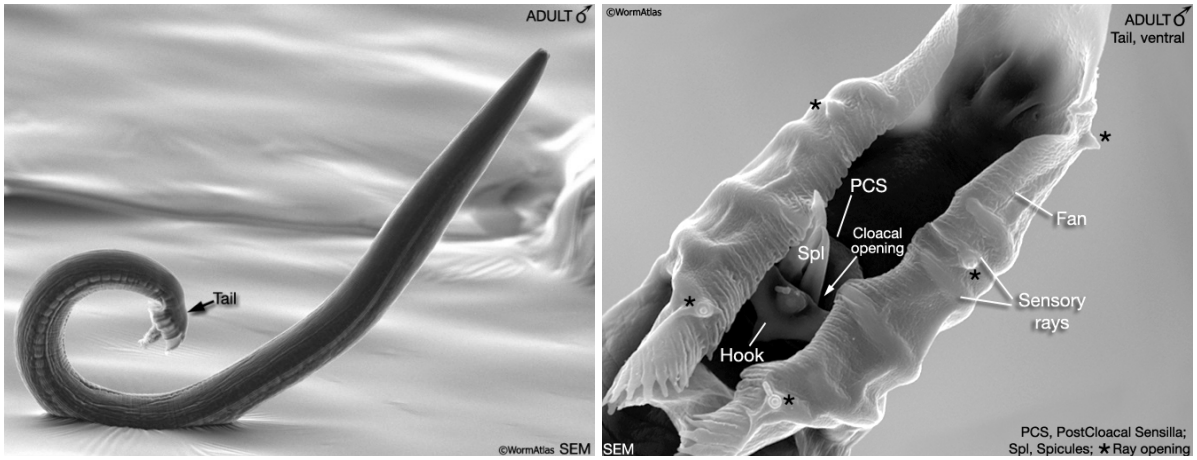


Figure 11 : Microscopie électronique à balayage de vers mâles

La photographie de gauche représente un ver mâle entier, la flèche désigne la queue présentant une morphologie différente de celle d'un ver hermaphrodite. La photographie de droite représente de manière plus précise l'extrémité de la queue du ver avec les spicules, notées Spl. Traduit et adapté depuis WormAtlas© (Drissi *et al.* 2014)

Ainsi, si les mâles sont capables de s'accoupler, la descendance croisée prévaut (Ward and Carrel 1979).

À l'âge adulte, *C. elegans* se compose d'environ 1000 cellules somatiques et de 1000 à 2000 cellules germinales. Pour être plus précis, chez les hermaphrodites, il existe exactement 959 noyaux de cellules somatiques et environ 2000 cellules germinales tandis que chez les mâles, il y a 1031 noyaux de cellules somatiques et 1000 cellules germinales (Alberts *et al.* 2002). Cependant, au cours du développement larvaire, un nombre plus important de cellules est observé, mais certaines (131 noyaux somatiques chez l'hermaphrodite et 147 noyaux somatiques chez le mâle) entrent en apoptose avant l'âge adulte (Malin and Shaham 2015).

2.2. Le système digestif

Les aliments (bactéries) pénètrent dans la partie antérieure des animaux et passent à travers le pharynx, une pompe neuromusculaire à deux lobes qui broie les aliments avant de les transmettre à l'intestin pour les digérer (Avery and You 2012). Le comportement de pompage des animaux dépend de la disponibilité et de la qualité de la nourriture. Par exemple, les animaux pompent plus lorsqu'ils ont faim et moins lorsqu'ils sont pleins (Avery and Shtonda 2003). L'étude du développement pharyngé a été un modèle pour l'organogenèse, incluant la façon dont la morphogenèse épithéliale et la spécification du destin cellulaire se produisent pendant le développement (Mango 2007). Par exemple, le facteur de transcription PHA-4 joue un rôle régulateur majeur dans l'identité de l'organe du pharynx (Mango *et al.* 1994). Les animaux présentant une déficience de la fonction PHA-4 ne contiennent pas de pharynx et les embryons surexprimant PHA-4 ont davantage de cellules pharyngées (Mango 2007). Les facteurs de transcription FoxA des vertébrés sont homologues de PHA-4 et sont impliqués dans le développement de l'intestin chez de nombreuses espèces (Carlsson and Mahlapuu 2002).

L'intestin de *C. elegans* est attaché au pharynx postérieur et consiste en 20 grosses cellules épithéliales polyploïdes disposées par paires qui forment un tube s'étendant sur toute la longueur de l'animal. Le développement intestinal a été étudié en détail (McGhee 2007). Probablement pour faire face aux demandes croissantes de l'animal en croissance, les cellules intestinales subissent un cycle de division nucléaire au cours du premier stade larvaire et des cycles suivants de réplication de l'ADN, mais pas de division nucléaire, au cours des derniers stades larvaires (Hedgecock and White 1985). *C. elegans* a servi de modèle pour étudier l'infection et la réponse à l'infection par différents agents pathogènes bactériens et fongiques,

microsporidies et virus qui colonisent le système digestif (Darby 2005 ; Balla and Troemel 2013 ; Diogo and Bratanich 2014).

2.3. Le système nerveux

Le système nerveux du nématode allie aussi bien simplicité que complexité. En effet, chez l'adulte, ce système se compose de seulement 302 neurones pour l'hermaphrodite et 383 neurones pour les mâles (Corsi *et al.* 2015).

La majorité des corps cellulaires neuronaux sont disposés dans quelques ganglions de la tête, du cordon ventral et de la queue (la queue masculine spécialisée contient la majorité des neurones supplémentaires). La plupart des neurones ont une structure simple avec un ou deux neurites mais quelques cellules, telles que les neurones mécanosensoriels FLP et PVD, possèdent des neurites très ramifiés (Dong *et al.* 2013). À l'exception des dendrites sensorielles, qui sont souvent faciles à identifier, la plupart des neurites ne peuvent pas être distingués comme axones ou dendrites, car ils donnent et reçoivent des synapses (bien qu'ils soient souvent appelés « axones »). Les neurites forment des synapses entre eux dans quatre domaines principaux : l'anneau nerveux (qui entoure le pharynx), le cordon nerveux ventral, le cordon nerveux dorsal et le neuropile de la queue. En plus des neurones, *C. elegans* possède plusieurs cellules de soutien ressemblant à des cellules gliales, principalement associées aux neurones sensoriels, mais qui ne sont pas aussi nombreuses que chez les vertébrés (Oikonomou and Shaham 2011).

3. Le cycle de vie du nématode

3.1. Reproduction et androdiécie

C. elegans est une espèce dite androdioïque c'est-à-dire que les individus qui la composent sont soit des hermaphrodites, soit des mâles. Le métazoaire est, dans l'immense majorité des cas (99,5 %), hermaphrodite autofécondant (gonosomes XX) c'est-à-dire que l'accouplement avec un autre ver n'est pas nécessaire à la formation d'œuf. Cependant, il existe également des vers dits mâles (XO) qui sont le résultat d'une erreur de répartition des gonosomes X lors de la méiose (Couillault and Kurz 2010). Pour se reproduire, ces mâles devront obligatoirement s'accoupler avec un hermaphrodite engendrant par la même occasion de nouveaux mâles avec une fréquence beaucoup plus élevée. Dans le cas de la reproduction des hermaphrodites, puisqu'il s'agit d'une autofécondation des gamètes femelles par les gamètes mâles du même individu, la descendance possédera le même patrimoine génétique

que le ver parent puisqu'il s'agit d'un clone (Couillault and Kurz 2010). D'une manière pratique, cette stabilité génétique de la lignée permet notamment de conserver des phénotypes liés à la mutation d'un gène d'intérêt au cours des générations, ce qui n'est pas possible avec les mâles (Corsi *et al.* 2015).

3.2. Le développement embryonnaire

Une fois les gamètes fertilisés, le développement embryonnaire va alors pouvoir se mettre en place. À 20 °C, le processus d'embryogenèse dure environ seize heures. Immédiatement après la fécondation, une sorte de coquille imperméable est formée autour de l'œuf permettant son développement de manière complètement indépendante de la mère. Néanmoins, les œufs sont habituellement retenus dans le corps de nématode parent jusqu'à ce qu'ils soient constitués de vingt-quatre cellules. À partir de ce moment, les œufs sont pondus et continuent leur développement jusqu'à être composé de 558 noyaux — certaines cellules étaient plurinucléaires, ce stade est qualifié de cœnocytique. Les œufs éclosent ensuite pour donner naissance à des larves L1 qui vont commencer à se nourrir des bactéries à disposition et continuer leur développement au travers des quatre stades (L1 à L4). Le stade L1 dure environ 16 heures tandis que les trois autres durent approximativement 12 heures. À la fin de chaque stade, les larves entrent dans un état léthargique caractérisé par une inactivité physique et par la synthèse d'une nouvelle cuticule suivie par la mue (Raizen *et al.* 2008). Environ 12 heures après la mue achevant le stade L4, les adultes vont commencer à se reproduire pendant une période de 2 à 3 jours jusqu'à l'épuisement de leur propre stock de sperme. Après la période de reproduction, les hermaphrodites peuvent vivre plusieurs semaines avant de mourir de sénescence (Corsi *et al.* 2015). Ce cycle de vie est décrit sur la Figure 12, mais à une température de 22 °C ce qui se traduit par une évolution entre les différents stades plus rapide.

Cas du stade dauer

En dehors des conditions de culture idéales et parfaitement contrôlées en laboratoire, *C. elegans* peut être amené à évoluer dans un environnement hostile (bactéries épuisées, vers trop nombreux) et non adapté à sa survie et au développement correct de ses progénitures.

Les larves L2 activent un cycle de vie alternatif (Hu 2007) et muent dans un stade larvaire alternatif L3 appelé larve « dauer » (« dauer » en allemand signifie « durable ») ; le signal est en réalité initié par des animaux L1, mais ses résultats ne sont pas visibles avant le stade dit « L2d » (Golden and Riddle 1984). C'est en 1975 que deux chercheurs, Cassada et

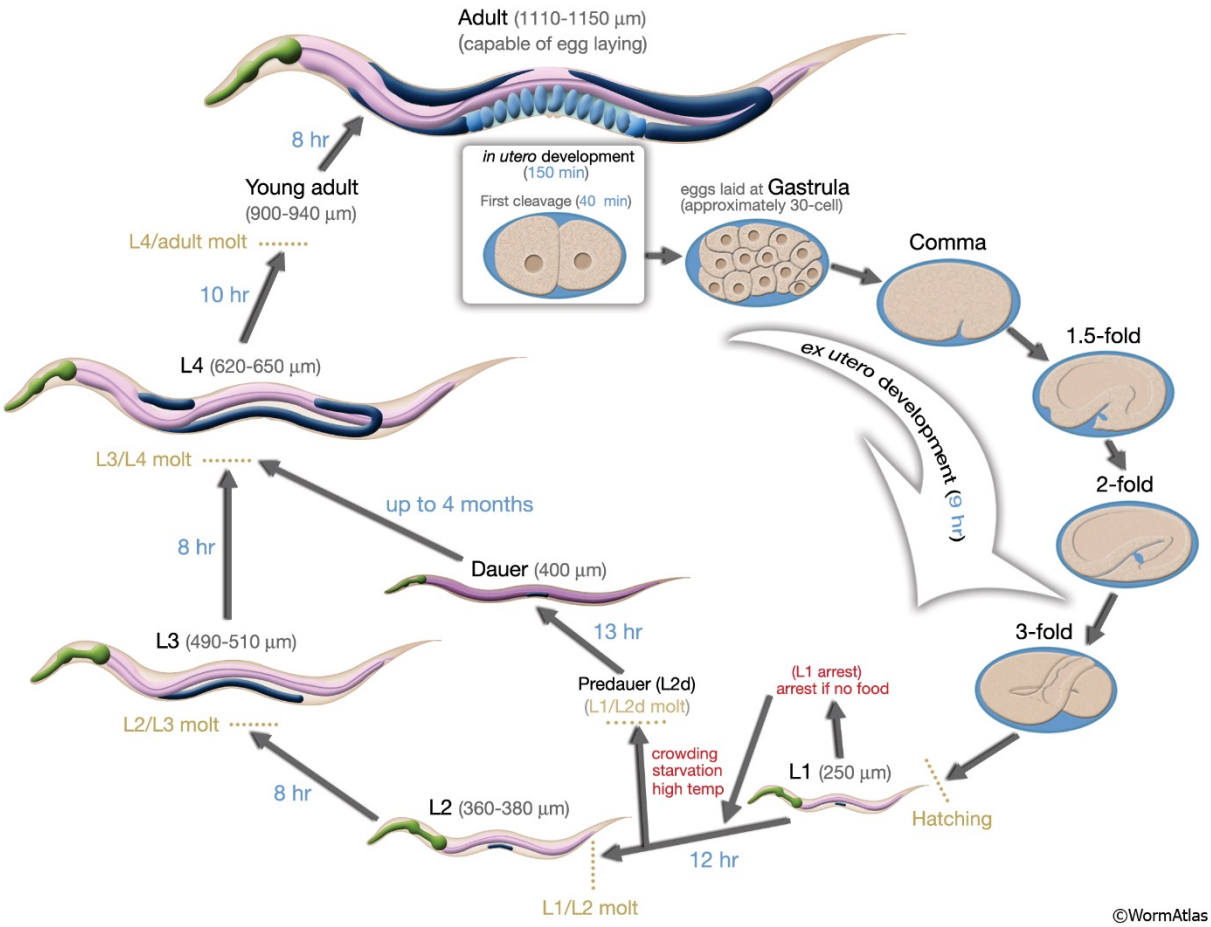


Figure 12 : Cycle de vie de *C. elegans* à 22 °C

Le temps 0 min correspond à la fertilisation des oocytes. Les durées en bleu indiquent le temps que passe l'animal à chaque étape tandis que la taille du ver est indiquée en gris. À partir de l'éclosion des œufs, le développement larvaire comporte 4 étapes : L1 à L4. Traduit et adapté depuis WormAtlas© (Altun and Hall 2009)

Russel, ont décrit une forme larvaire particulière nommée dauer. Ces larves se forment juste après la seconde mue puis arrêtent leur développement dans l'attente de meilleures conditions de vie (Hu 2007). La cuticule de la larve dauer entoure complètement l'animal et obstrue la bouche, l'empêchant ainsi de manger et empêchant ainsi son développement. La cuticule de la larve dauer a une résistance accrue aux produits chimiques, ce qui lui confère une plus grande protection contre les agressions environnementales et les agents corrosifs. Celles-ci peuvent survivre pendant de nombreux mois et constituent la forme de dispersion la plus couramment rencontrée dans la nature. Ainsi, lorsque les larves dauer sont transférées sur des boites de Pétri avec des bactéries en quantité suffisante, elles se débarrassent de leurs « bouchons » obstruant l'orifice buccal, muent et continuent leur développement sous forme de larves L4.

4. *C. elegans*, un modèle pour l'étude des relations hôte — microorganismes probiotiques et pathogènes

C. elegans semble être un candidat pertinent et puissant en tant que modèle pour les études à haut débit, en raison de sa culture facile, de son coût peu élevé, de sa transparence et des nombreuses homologies génétiques partagées avec les humains. Plusieurs études ont déjà montré l'intérêt de *C. elegans* pour évaluer le potentiel probiotique des bactéries, car elles sont capables de donner au ver une durée de vie plus longue, une résistance accrue aux agents pathogènes et aux stress oxydatifs ou thermiques (Ikeda *et al.* 2007 ; Grompone *et al.* 2012 ; Nakagawa *et al.* 2016 ; Chelliah *et al.* 2018). Les bactéries probiotiques sont de plus en plus utilisées pour prévenir ou traiter la dysbiose microbienne et les pathologies associées. Leurs mécanismes d'action sont encore largement inconnus ou sont basés sur des données empiriques. Par conséquent, le développement d'approches permettant de caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans leur effet probiotique devient essentiel. *C. elegans* représente un moyen puissant et bioéthique de concevoir des études à grande échelle afin d'explorer l'aspect moléculaire des interactions entre un microorganisme et l'hôte.

Avec l'apparition de microorganismes probiotiques, y compris les bactéries productrices d'acide lactique (LAB), dans le traitement des maladies liées à la dysbiose notamment intestinale, la question est de comprendre les mécanismes d'action de ces souches et de déterminer comment cribler efficacement les collections afin de sélectionner de nouveaux probiotiques. Dans tous les cas, l'étude approfondie du microbiote intestinal reste difficile et nécessite de nombreuses étapes combinant études *in vitro*, tests sur des animaux de laboratoire et enfin sur des humains (Lacroix *et al.* 2015). Le nombre actuel de méthodes

in vivo permettant l'analyse rapide et fiable de collections utilisant des modèles multicellulaires complexes est encore trop limité. Principalement pour des raisons de coût, d'infrastructure et d'éthique, il n'est certainement pas possible d'utiliser des animaux de laboratoire tels que des souris ou des rats aux premiers stades de la recherche (Richmond 2002 ; Grompone *et al.* 2012).

Ce chapitre se concentre sur des études utilisant *C. elegans* pour étudier son interaction avec des bactéries lactiques ayant démontré des capacités probiotiques. L'étude des interactions hôte-microorganisme au niveau moléculaire à l'aide d'approches génétiques et mécanistiques directes nécessite le développement de modèles animaux simples. La pertinence et les avantages de l'utilisation de *C. elegans* en tant qu'organisme modèle pour l'identification de nouvelles souches potentiellement probiotiques sont analysés. Une nouvelle utilisation du ver dans le but de cribler des collections de microorganismes pour des caractères probiotiques spécifiques est également envisagée. Soixante-quatre publications centrées sur *C. elegans* et les probiotiques sont référencées dans la base de données PubMed, dont 16 ont été publiées en 2019, confirmant l'émergence de ce modèle dans ce domaine de recherche.

4.1. Les microorganismes probiotiques influencent la durée de vie du nématode

Avant de pouvoir caractériser une souche probiotique, la confirmation de l'absence de pouvoir pathogène de cette souche est nécessaire. L'une des méthodes *in vivo* les plus couramment utilisées est l'étude de la survie du nématode (Park *et al.* 2017).

4.1.1. Effets positifs et négatifs des probiotiques sur l'espérance de vie du ver

Comme la plupart des organismes vivants, les sources de nutriments utilisées pour la croissance et la propagation de *C. elegans* ont un impact direct sur sa santé, ses défenses contre les agents pathogènes et sa durée de vie (Ikeda *et al.* 2007).

Des études ont montré que la durée de vie du ver est augmentée quand il se propage sur des cultures axéniques (Lenaerts *et al.* 2008), ou sur milieu gélosé avec des bactéries tuées par irradiation aux rayons ultraviolets (UV) (Nakagawa *et al.* 2016 ; Kato *et al.* 2018).

Les lactobacilles augmentent significativement la durée de vie moyenne de *C. elegans* N2 (type sauvage) par rapport aux conditions dans lesquelles il est nourri avec son aliment de

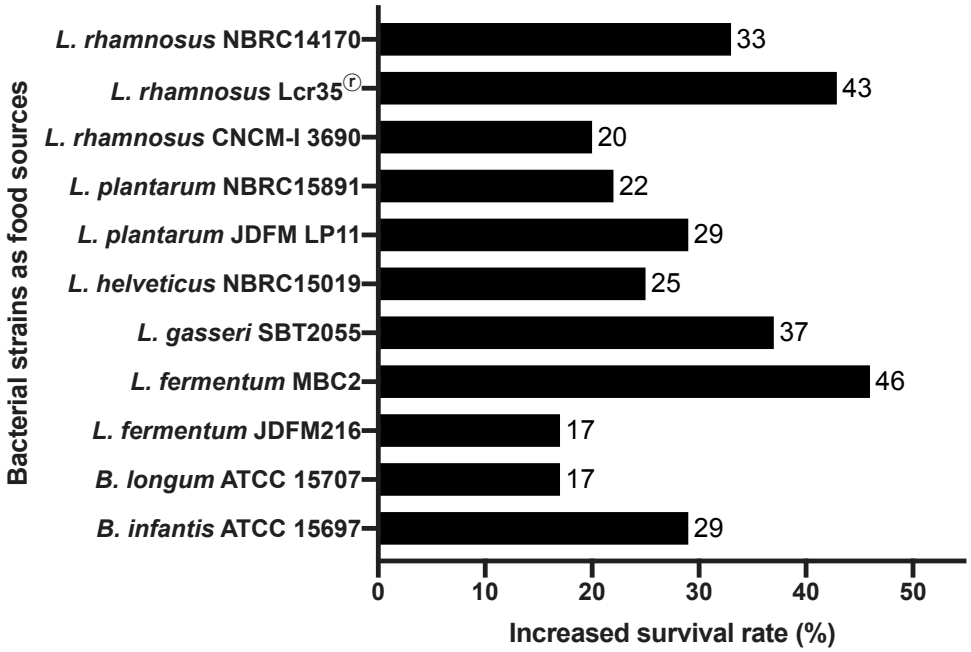


Figure 13 : Durée de vie de *C. elegans* N2 nourri avec des bactéries lactiques comparé à des vers nourris avec *E. coli* OP50.

L'augmentation du taux de survie est représentée pour chaque souche sous forme de pourcentage du taux de survie par rapport à ceux nourris avec *E. coli* OP50 (Ikeda *et al.* 2007 ; Grompone *et al.* 2012 ; Sun *et al.* 2016 ; Heo *et al.* 2018 ; Park *et al.* 2018 ; Poupet, Saraoui *et al.* 2019 ; Sharma *et al.* 2019 ; Schifano *et al.* 2019).

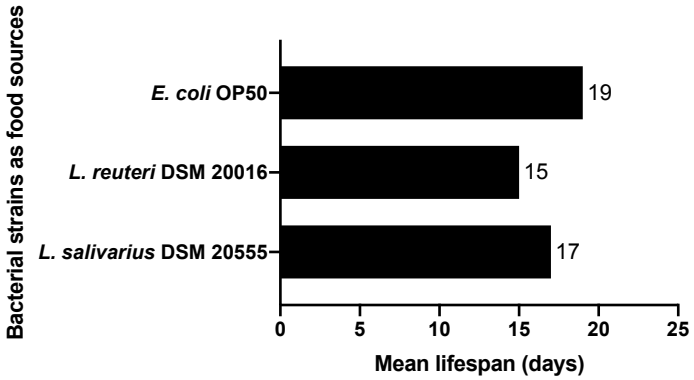


Figure 14 : Effets négatifs de *L. salivarius* et *L. reuteri* sur la durée de vie de *C. elegans*

La longévité de *C. elegans* est représentée en jours pour chaque souche (Fasseas *et al.* 2013).

base, *E. coli* OP50. Il a été démontré que neuf lactobacilles et trois bifidobactéries augmentent la survie des nématodes sauvages (N2) de 17 % à un maximum de 37 % (Figure 13) (Grompone *et al.* 2012 ; Heo *et al.* 2018 ; Park *et al.* 2018 ; Sharma *et al.* 2019 ; Schifano *et al.* 2019). D'autres études ont montré que des *Lactobacillus* (*helveticus*, *plantarum* et *rhamnosus*) ou *Bifidobacterium* (*infantis* et *longum*) cultivés dans des conditions anaérobies, ont également permis l'augmentation de la longévité de *C. elegans* avec respectivement 25, 22, 33, 29 et 17 % d'augmentation (Ikeda *et al.* 2007; Sun *et al.* 2016).

Il a été démontré que l'augmentation significative de la survie de *C. elegans* en présence LG2055 se produit à la fois avec des bactéries vivantes et des bactéries tuées par les UV. Cette potentialisation était corrélée au rapport *E. coli* OP50 / LG2055 utilisé, plus le rapport est petit, plus le taux de survie est élevé (Nakagawa *et al.* 2016). Une autre étude a montré qu'un mélange de *B. infantis* et de *E. coli* OP50 dans différentes proportions avait un effet sur la longévité du ver. Les auteurs suggèrent que le mécanisme utilisé par la bactérie pour favoriser la longévité du ver impliquait la voie de signalisation p38 MAPK jusqu'à l'induction de l'expression du gène *skn-1* et des gènes cibles de SKN-1, codant pour les protéines antioxydantes (enzymes de détoxification de phase 2) (Nakagawa *et al.* 2016). Ils ont également constaté que la paroi cellulaire (acides lipotéichoïques) des bifidobactéries joue un rôle clé dans l'augmentation de la longévité des nématodes, ce qui est en adéquation avec une étude portant sur *B. longum* (Komura *et al.* 2013; Zhao *et al.* 2017). Une autre étude a montré une stimulation de la longévité de *C. elegans* via *pmk-1* et le récepteur nucléaire des hormones (NHR), une famille de récepteurs associée à la longévité chez l'homme et les animaux, y compris *C. elegans*, même si le mécanisme sous-jacent chez l'homme reste méconnu (Mooijaart *et al.* 2005).

D'autre part, les travaux de Fasseas *et al.* ont montré que certaines souches de LAB pouvaient avoir un impact négatif sur la durée de vie du ver (Figure 14). Les vers adultes de *C. elegans* N2 nourris avec des cellules bactériennes vivantes appartenant aux espèces *L. salivarius* et *L. reuteri* ont montré une réduction significative de leur durée de vie moyenne par rapport à ceux nourris avec *E. coli* OP50 avec une moyenne de 17, 15 et 19 jours respectivement. *L. salivarius* vivant a la capacité de rétablir une durée de vie normale pour le mutant de courte durée *C. elegans daf-16* (Fasseas *et al.* 2013). Sugawara *et al.* ont montré que les vers nourris avec *B. longum* tué en plus de *E. coli* OP50 présentaient une réduction de la longévité de manière dose-dépendante. De plus, les vers vieillissants nourris avec seulement *B. longum* tué ont montré une durée de vie plus longue que ceux nourris avec *E. coli* seul. Cette étude a révélé que les effets de *B. longum* tués chez *C. elegans* étaient médiés par la localisation nucléaire du facteur de transcription DAF-16 conduisant à la surexpression

des gènes cibles de DAF-16 (Sugawara and Sakamoto 2018). Ces résultats sont en contradiction avec les observations précédentes avec différentes souches de *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*, qui ont montré le rôle de SKN-1 indépendamment de DAF-16 (Sugawara and Sakamoto 2018).

Considérant un panel plus large de souches probiotiques, Kato *et al.* ont montré que *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588 vivant et tué par ultraviolets prolonge la durée de vie de *C. elegans* en régulant la voie de signalisation insuline / IGF-1 (IIS) et le facteur de transcription Nrf2, et améliore la résistance à plusieurs stress chez *C. elegans* comme l'infection par des bactéries pathogènes (*Salmonella enterica* et *S. aureus*), l'irradiation UV et au facteur de stress métallique induit par l'ion Cu^{2+} (Kato *et al.* 2018). Deux autres bactéries de l'intestin humain et présentant des capacités probiotiques, *B. pullicaecorum* et *M. elsdenii*, prolongent la durée de vie de *C. elegans* par la voie du facteur de croissance transformant β (TGF-β) associé à des processus anti-inflammatoires du système immunitaire inné (Kwon *et al.* 2018).

Bien qu'il y ait des espèces probiotiques avec des effets positifs (Grompone *et al.* 2012 ; Komura *et al.* 2013 ; Nakagawa *et al.* 2016) et d'autres avec des effets négatifs (Fasseas *et al.* 2013) sur la durée de vie du nématode, il y en a aussi qui n'ont pas d'effet significatif sur la durée de vie des nématodes. Ces espèces incluent, par exemple, *L. helveticus* JCM1120^T (Nakagawa *et al.* 2016) ou *Pediococcus acidilactici* tué par traitement UV (Fasseas *et al.* 2013).

De nos jours, bien que les bienfaits pour la santé sur les animaux supérieurs par les probiotiques sont incontestables, il n'y a aucune preuve d'une amélioration de l'espérance de vie induite par ces microorganismes, sauf avec le nématode (Ikeda *et al.* 2007). Considérant que les voies qui influencent le vieillissement et la longévité sont bien conservées parmi les espèces eucaryotes, de la levure aux mammifères, y compris *C. elegans* (Fontana *et al.* 2010; Kenyon 2010), l'utilisation de ce modèle pour évaluer les avantages potentiels du LAB sur la santé humaine au cours du vieillissement et de la longévité et pour comprendre les interactions hôte-microorganismes est prometteuse. La voie de signalisation de l'insuline / IGF-1 (IIS) est au centre des discussions concernant la longévité et la santé de *C. elegans*. Des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer si les vers à durée de vie longue ayant un IIS non fonctionnel (mutant *daf-2*) jouissent d'une meilleure santé en raison de leur durée de vie prolongée et pour comprendre comment le vieillissement est retardé chez *C. elegans*. Ces nouvelles connaissances permettraient la mise en place de nouveaux paradigmes applicables à des organismes plus complexes tels que l'homme (Ewald *et al.* 2018).

4.1.2. Mécanismes et voies de signalisation impliqués

Chez *C. elegans*, la régulation de l'espérance de vie implique au moins trois voies de signalisation : DAF-2 / DAF-16 (voie de signalisation analogue à l'insuline), p38 MAPK et JNK. Dans la voie DAF-2 / DAF-16, l'activation du récepteur transmembranaire DAF-2 induit une cascade de phosphorylation via AGE-1 / PI3K (phosphoinositide 3— kinase) et les sérine-thréonine kinases (PDK-1, AKT-1, AKT-2) qui régulent négativement le facteur de transcription DAF-16 / FOXO en le phosphorylant. Lorsque DAF-16 est déphosphorylé, il est transféré dans le noyau où il active la transcription des gènes impliqués dans le contrôle de la durée de vie (Murphy and Hu 2013).

La voie p38 MAPK (également appelée PMK-1) est activée par phosphorylation par MAPKK en amont (SEK-1), qui est activée par MAPKKK (NSY-1). Il joue un rôle dans la régulation de l'espérance de vie en modulant la réponse immunitaire spécifique du ver et s'est avéré nécessaire pour sa résistance à l'infection bactérienne (Xu *et al.* 2013). Sous le contrôle de PMK-1, des antimicrobiens potentiels sont sécrétés, tels que des lectines de type C, des toxines ShK ou des gènes analogues à CUB en réponse à une infection à *P. aeruginosa*. En outre, une analyse complète de l'expression du génome suggère que les DAF-2 / DAF-16 et p38 MAPK voies sont deux voies distinctes, car elles ne régulent pas positivement les mêmes gènes en même temps (Zhou *et al.* 2018). Une autre étude a montré que PMK-1 contribue à la longévité accrue des mutants *daf-2* et que cette augmentation est transmise par DAF-16 via l'augmentation de l'expression des antimicrobiens (Troemel *et al.* 2006). PMK-1 peut jouer un rôle similaire via des effecteurs immunitaires distincts pour augmenter la durée de vie, suggérant que l'immunité innée est un facteur déterminant de la longévité. Étant donné que l'immunité est également étroitement associée à la longévité humaine, la caractérisation plus poussée de l'interaction entre l'immunité et la longévité chez *C. elegans* peut nous fournir de nouvelles informations sur les mécanismes du vieillissement humain et des maladies liées à l'âge.

La voie JNK (c-Jun N-terminale kinase) est activée par les cytokines et en réponse à des stress tels que l'irradiation UV, les espèces réactives de l'oxygène (ROS), les dommages à l'ADN, le stress thermique et l'inflammation (Neumann-Haefelin *et al.* 2008 ; Wolf *et al.* 2008). Chez *C. elegans*, cette voie évolue parallèlement à la voie de signalisation de l'insuline jusqu'à ce qu'elle converge vers DAF-16, qui est phosphorylée par JNK-1 (Oh *et al.* 2005; Marudhupandiyan and Balamurugan 2017). Il a été démontré que l'activation de la voie de signalisation JNK-1 - DAF-16 conduisant à la surexpression du gène *sod-3* (superoxyde

dismutase) était activée par *B. longum* BB68 afin d'augmenter la longévité du nématode (Zhao *et al.* 2017).

Dans le cas de *B. subtilis* NCIB3610, plusieurs mécanismes expliquant ses effets bénéfiques sur *C. elegans* ont été proposés. La formation d'un biofilm dans l'environnement intestinal favorisait la longévité du ver. L'expression du gène *bslA* et des opérons *tapA-sipW-tasA* et *epsA-G*, codant pour des composants essentiels à la formation du biofilm (hydrophobine, protéine TasA et l'exopolysaccharide EPS, respectivement), a été identifiée comme nécessaire à l'extension de la longévité du ver (Donato *et al.* 2017). Le second mécanisme est basé sur l'utilisation d'oxyde nitrique (NO) bactérien pour médier l'extension de la durée de vie via l'expression d'un groupe de gènes fonctionnant sous le double contrôle des facteurs de transcription HSF-1 (un activateur des protéines de choc thermique) et DAF-16 (Gusarov *et al.* 2013). *C. elegans*, qui est incapable de synthétiser NO, car il lui manque la NO synthase, utilise celle produite par la bactérie pour réguler son propre métabolisme (Clark and Hodgkin 2014 ; Donato *et al.* 2017). Le NO fournit une meilleure thermotolérance en raison de l'activation de HSF-1 (Gusarov *et al.* 2013). Une autre étude portant sur *Lactobacillus fermentum* MBC2 a mis en évidence le rôle du métabolisme des graisses dans la viabilité de *C. elegans*, confirmant ainsi la forte corrélation entre la réduction du stockage des graisses et la prolongation de la durée de vie des nématodes. Ils ont montré un effet de prolongévité dépendant de PEPT-1, médié par le facteur de transcription DAF-16 ; le gène *pept-1* étant l'un des principaux régulateurs du stockage des lipides chez *C. elegans* (Schifano *et al.* 2019).

Des études récentes suggèrent un rôle clé des molécules détectant le quorum bactérien dans la répression de l'infection à *C. elegans* avec les agents pathogènes *C. albicans* ou *P. aeruginosa*, montrant que le nématode peut détecter les signaux microbiens et développer une interaction symbiotique (S. Oh *et al.* 2012 ; Rasamiravaka *et al.* 2015). Le pentapeptide de quorum-sensing CSF (*Competence Sporulation Stimulating Factor*) de *B. subtilis* a joué un rôle dans l'extension de la longévité des nématodes (Donato *et al.* 2017). Il a été rapporté que le CSF de *B. subtilis* contribuait à l'homéostasie intestinale de l'hôte en activant les voies de survie de p38 MAPK et en induisant la synthèse de protéines de choc thermique cytoprotectrices (HSP) (Fujiya *et al.* 2007 ; Williams 2007). La survie du nématode est probablement due à des molécules impliquées dans le quorum-sensing comme le NO et CSF ainsi qu'à la formation de biofilm (Donato *et al.* 2017).

Toutes ces données ont mis en évidence l'idée que chaque souche de LAB peut exercer un effet bénéfique sur *C. elegans* via plusieurs mécanismes et voies spécifiques. En raison de son potentiel d'utilisation facile et du grand nombre de mutants (mutants *sek-1* ou DAF-16::GFP par exemple), *C. elegans* apparaît comme un modèle *in vivo* efficace pouvant

être utilisé pour le criblage de collections de microorganismes dans le but d'identifier de nouvelles souches probiotiques potentielles et d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués.

4.2. L'immunité chez *C. elegans* : une réponse adaptée aux stress biotiques et abiotiques

Placé dans un environnement naturel, le nématode *C. elegans* est confronté à une multitude de microorganismes. La plupart d'entre eux ne représente aucun danger pour l'animal qui ira jusqu'à s'en nourrir. Cependant, il sera amené au cours de son existence à être en contact avec certaines espèces pathogènes pouvant entraîner à terme sa mort.

D'un point de vue histologique, la totalité du corps du nématode peut être la cible d'une infection microbienne comme présentée sur le schéma de la Figure 15. L'intestin, principal organe de *C. elegans*, est ainsi le principal foyer infectieux pour des pathogènes. En effet, le ver se nourrissant principalement de bactéries, mais également de levures (i.e. *S. enterica*, *S. aureus*, *Cryptococcus neoformans* ou *C. albicans*), celles-ci vont passer dans le tractus digestif, s'accumuler dans la lumière intestinale et déclencher une infection. Il faut préciser également que le pouvoir pathogène de certaines bactéries est renforcé par la synthèse de toxines (indiqué à l'aide d'un astérisque sur la figure). Par ailleurs, certains pathogènes vont par ailleurs être capables d'envahir les cellules intestinales, se multiplier puis se disséminer dans tout le nématode comme *S.* Typhimurium ou la microsporidie *Nematocida parisii*. D'autres pathogènes, quant à eux, vont infecter l'animal de l'extérieur en détruisant son épiderme (*Drechmeria coniospora*), en envahissant la zone utérine ou bien en provoquant une inflammation de l'anus (*Microbacterium nematophilum*).

Afin de se protéger de telles agressions, *C. elegans* a mis en place différentes stratégies visant d'une part à empêcher une infection et d'autre part à lutter contre le pathogène si l'infection a lieu. Pour limiter les infections, le nématode dispose de trois techniques :

- la fuite face au pathogène au moyen de la détection de pathogènes grâce à ses neurones chimiosensoriels (Engelmann and Pujol 2010) ;
- une cuticule épaisse faisant office de barrière naturelle (équivalent de notre peau) (Page and Johnstone 2007) ;
- un broyeur (équivalent de l'estomac) permettant de lyser les microorganismes les empêchant d'atteindre intact l'intestin (Leon Avery and You 2012).

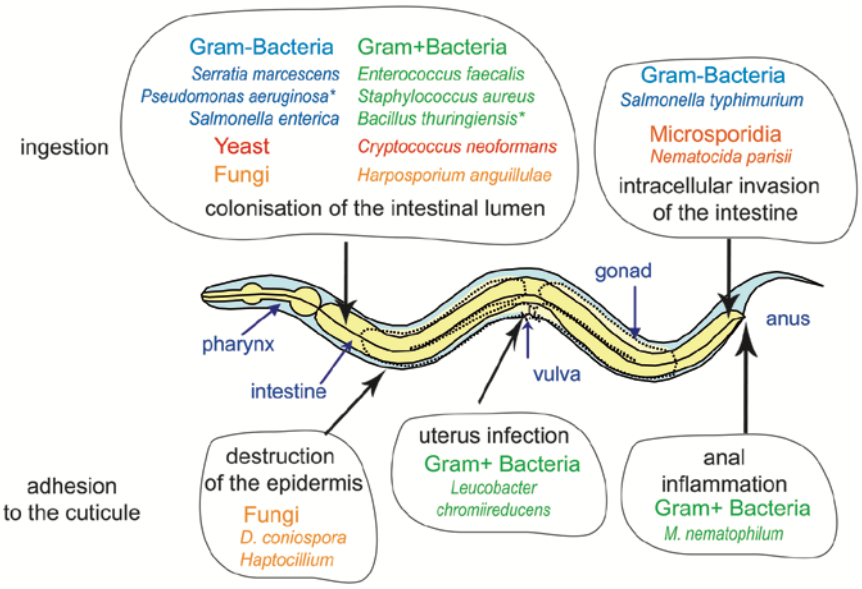


Figure 15 : Tissus de *C. elegans* potentiellement infectés par des microorganismes pathogènes.

(Engelmann and Pujol 2010)

Dès lors que ces moyens ne sont plus efficaces et qu'une infection a lieu, une réponse du système immunitaire de l'hôte va se mettre en place au moyen de la mobilisation de nombreux mécanismes moléculaires décrits ci-après.

4.2.1. Stratégies de lutte contre les pathogènes

L'autophagie

Une des stratégies mises en place par le nématode pour se protéger des pathogènes est l'autophagie (Figure 16). Ce processus consiste en la synthèse *de novo* d'une membrane ou autophagosome autour d'un composé cellulaire endommagé ou d'un pathogène intracellulaire visant à sa destruction et au recyclage des molécules le composant (Cohen and Troemel 2015).

Lorsque ce phénomène implique la destruction d'un pathogène, on parle aussi de « xenophagie ». Ce mécanisme de défense a été particulièrement bien décrit dans le cas d'une infection à *S. enterica* serovar Typhimurium. Cette entérobactérie infectant l'intestin est un pathogène intracellulaire facultatif comme présenté sur la Figure 15. Selon plusieurs études, il a été montré que l'autophagie empêchait l'invasion des cellules intestinales par *Salmonella*, qui reste alors au niveau de la lumière de l'intestin (Jia *et al.* 2009 ; Curt *et al.* 2014). Par ailleurs, il est indiqué qu'une mutation du gène *bec-1* au niveau intestinal rendait inopérant le mécanisme autophagique induisant une invasion des cellules intestinales par le pathogène rendant alors le nématode plus susceptible à l'infection (Curt *et al.* 2014). De plus, Jia *et al.* (2009) a démontré que les deux principaux gènes de l'autophagie, *bec-1* et *lgg-1*, sont impliqués dans la régulation de la voie de l'insuline (DAF-2/ILR) chez les mutants à durée de vie longue (*daf-2*).

Bien que l'autophagie ne semble adaptée qu'à l'élimination de pathogènes intracellulaires, d'autres études ont pu mettre en évidence qu'elle pouvait induire une résistance face aux pathogènes habituellement extracellulaires. En effet, il semble que le facteur de transcription TFEB-1 induit l'expression de gènes antimicrobiens dirigés contre *S. aureus* (Visvikis *et al.* 2014) tandis que l'autophagie est capable de prévenir la nécrose cellulaire dans le cas d'une infection à *P. aeruginosa* (Zou *et al.* 2014). Enfin, selon Cohen and Troemel (2015), ces deux phénomènes ne permettraient pas de réduire la charge bactérienne, mais favoriseraient une tolérance de l'hôte vis-à-vis des pathogènes.

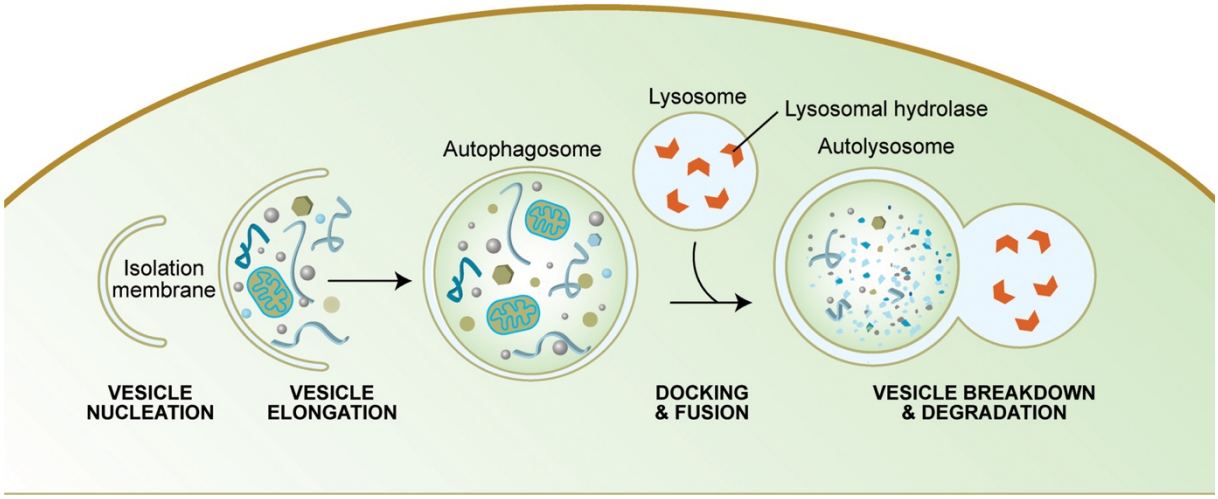


Figure 16 : Les grandes étapes de l'autophagie

(Meléndez 2009)

L'apoptose

L'apoptose ou mort cellulaire programmée (PCD) est un processus cellulaire conservé utilisé par les organismes pluricellulaires afin de maintenir l'homéostasie durant les phases de développement ainsi que pour prévenir la multiplication de cellules ayant subi des dommages sur l'ADN. Chez *C. elegans,* 131 cellules somatiques bien définies subissent l'apoptose pendant la phase de développement. Par ailleurs, la plupart des effecteurs de l'apoptose retrouvée chez le ver sont conservés chez les mammifères (Arvanitis *et al.* 2013). En plus des rôles habituellement attribués à l'apoptose, certaines études ont mis en évidence qu'elle permet au nématode une protection efficace contre certains pathogènes. En effet, il s'avère qu'en présence de *S.* Typhimurium, une augmentation du nombre de cellules somatiques mortes a été observée en raison de l'activation de la voie EGL-1/CED-9/CED-4/CED-3 (Aballay and Ausubel 2001). Par la suite, les auteurs ont démontré que la voie de l'apoptose était directement impliquée dans la réponse immunitaire du nématode. En effet, selon Aballay *et al.* (2003), l'inactivation du gène *pmk-1* de la voie p38 MAPK, induit également une inactivation de l'apoptose. De plus, il apparaît que la connexion entre les voies p38 MAPK et PCD a lieu au travers de CED-9. De ce fait, la combinaison de ces deux voies favorise la résistance du nématode en sacrifiant certaines de ses cellules afin de limiter l'infection par le pathogène.

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont de puissants oxydants (*i.e.* radical superoxyde $O_2^{\bullet -}$, peroxyde d'hydrogène H_2O_2, ozone O_3), très instables, pouvant entraîner chez les êtres vivants de graves dommages en oxydant les protéines, les lipides et surtout en endommageant l'ADN. Lorsque ces dommages sont trop importants, ceux-ci peuvent entraîner la mort cellulaire. Cependant, les ROS ne sont pas uniquement délétères pour les cellules. En effet, des études ont montré qu'ils jouaient un rôle important dans la réponse immunitaire (Mccallum and Garsin 2016).

La production de ROS par l'hôte doit être régulée spatialement et temporellement de manière précise afin de limiter les effets délétères de ces composés chimiques. Ceux-ci sont produits par la réduction de l'oxygène moléculaire par le NADPH, catalysée par des enzymes de la famille des NADPH oxydase / dual oxydase (NOX/DUOX) (Mccallum and Garsin 2016). Le génome de *C. elegans* code pour deux protéines DUOX hautement conservées : Ce-Duox1/BLI-3 et Ce-Duox2 (Chávez *et al.* 2009). Ce-Duox1/BLI-3 permet la synthèse de ROS à visée immunitaire au niveau de l'épiderme, mais aussi de l'intestin notamment en cas d'infection par *C. albicans* (Jain *et al.* 2013). De plus, ces ROS ont deux actions (Figure 17) : une action inhibitrice directe en tuant l'agent infection et une action indirecte en modulant

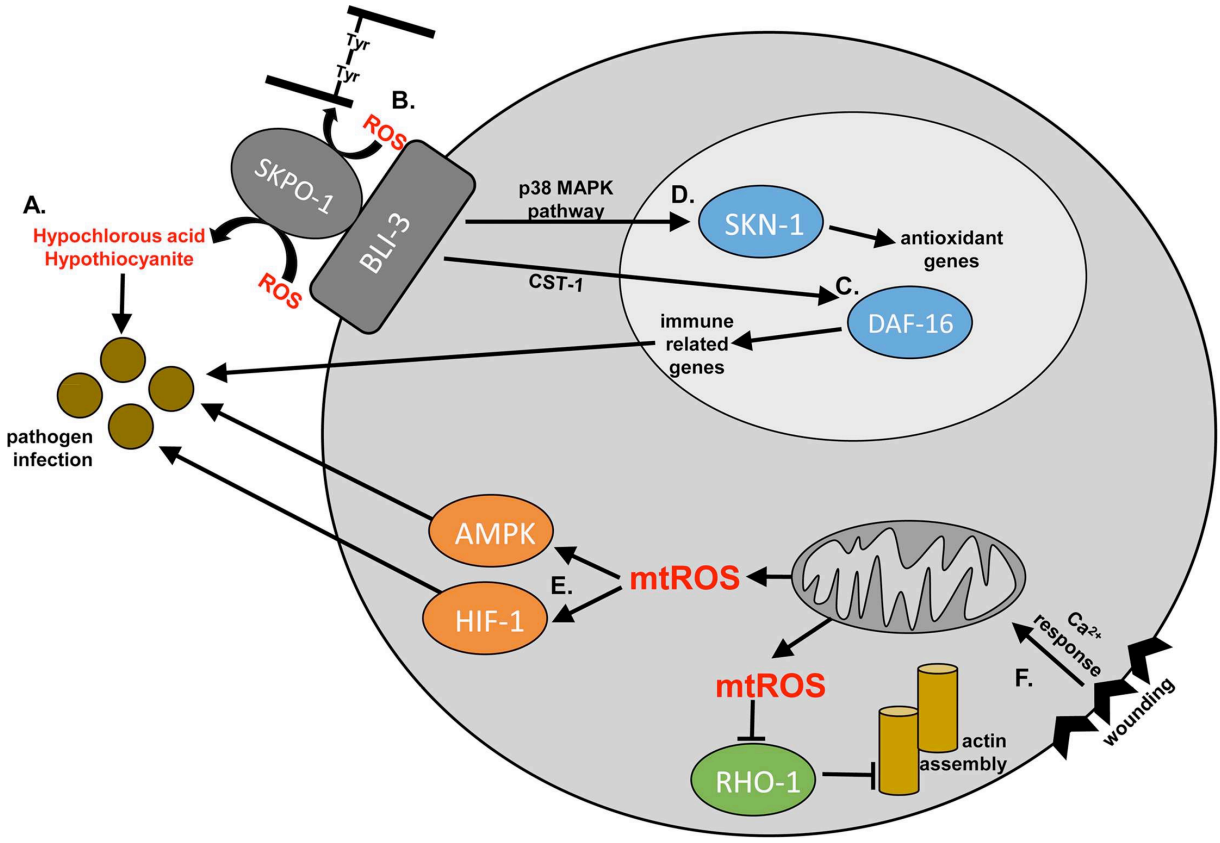


Figure 17 : Mécanismes moléculaires entre ROS et immunité

(Mccallum and Garsin 2016)

Au cours d'une infection par un agent pathogène, les ROS générées par BLI-3 peuvent être utilisées (A) par SKPO-1 pour générer des antimicrobiens plus puissants (B) afin de maintenir des barrières de protection ; (C) activer le DAF-16, via l'oxydation de CST-1, pour augmenter l'expression de gènes de réponse immunitaire protecteurs; et/ou (D) en tant que molécule de signalisation pour activer SKN-1, via la voie p38 MAPK, afin de maintenir l'homéostasie redox au cours de l'infection. L'infection par un agent pathogène stimule également la libération de ROS mitochondriales (mtROS). Ces mtROS (E) facilitent l'immunité dépendante de HIF-1 et AMPK. (F) Alternativement, pendant l'infection, la libération de calcium dépendante de la plaie provoque la libération de mtROS, soulageant ainsi la répression de l'assemblage d'actine de protection via l'oxydation de RHO-1.

l'expression des gènes de l'immunité via le facteur de transcription DAF-16 et la voie p38 MAPK.

Par ailleurs, il existe une autre source de ROS dans la cellule qui est la mitochondrie. On parle alors de ROS mitochondriaux (mtROS), dont la synthèse est stimulée par la présence de pathogènes. En effet, il a été montré que l'expression de gènes de l'immunité inhibait la respiration mitochondriale et augmentait la production de mtROS (Mccallum and Garsin 2016).

Une présentation plus détaillée des ROS a été réalisée en Annexe 2.

4.2.2. Les voies de signalisation

Voie DAF-2/Insulin-like receptor (ILR)

La voie DAF-2 (*abnormal Dauer formation*) / ILR, également appelée DAF-2/IGF (insulin-like growth factor) est une voie bien caractérisée, d'un point de vue mécanistique. Elle est impliquée dans la régulation des phénomènes liés au vieillissement ainsi qu'à l'immunité de *C. elegans* (Millet and Ewbank 2004). Cette voie, décrite sur la Figure 18, est activée par DAF-28, un peptide du type insuline se fixant sur le récepteur membranaire DAF-2. Il en résulte l'activation de AGE-1 (phosphatidylinositol-3OH kinase) qui va catalyser la phosphorylation du phosphatidylinositol bisphosphate (PIP2) en phosphatidylinositol triphosphate (PIP3). Par la suite, PIP3 va d'une part se fixer sur le complexe AKT-1/AKT-2 ce qui va révéler deux sites de phosphorylation et d'autre part recruter PDK-1 permettant l'activation par phosphorylation de AKT-1. Enfin, le facteur de transcription FOXO DAF-16 est phosphorylé par AKT-1 provoquant de ce fait sa rétention dans le cytoplasme. En revanche, lorsque DAF-2 fixe INS-1 ou lorsque celui-ci n'est pas exprimé (mutation ou RNAi), la voie n'est pas activée. Ceci se traduit par une translocation de DAF-16 non phosphorylé depuis le cytoplasme vers le noyau. Ainsi, cette translocation aura pour effet la régulation de gènes de réponse au stress et d'antimicrobiens (Ewbank 2006).

À l'aide d'analyses sur puces à ADN, Murphy *et al.* (2003) a mis en évidence que de nombreux gènes d'antimicrobiens étaient sous la dépendance de DAF-16. Parmi les gènes surexprimés, on retiendra *lys-7*, *lys-8* codant pour des lysozymes ainsi que des saposines (*dod-5, spp-1*) et des thaumatines (*dod-2*) ayant des activités antifongiques notamment chez les plantes. Par ailleurs, des gènes impliqués dans la détoxification et dans la résistance aux stress sont aussi surexprimés comme une métallothionéine (*mtl-1*), des gluthathion S-transférases, des catalases (*ctl-1* et *ctl-2*) et des superoxyde dismutases (*sod-3*). En revanche, DAF-16 induit une répression de gènes réduisant la durée de vie du nématode, comme par exemple *ins-7*, un peptide du type insuline/IGF-1, un ligand activant le récepteur DAF-2. Par

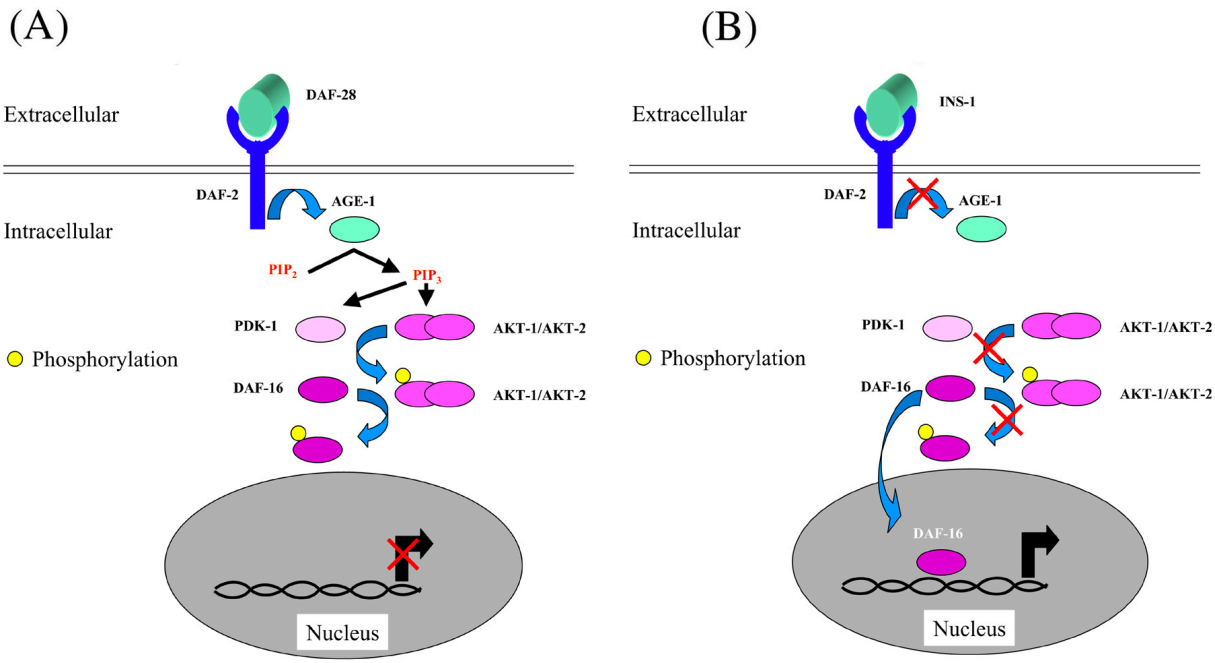


Figure 18 : Voie DAF-2/Insulin-Like Receptor (DAF-2/ILR)

(Ewbank 2006)

ailleurs, il a été démontré que des nématodes mutés pour le gène *daf-2* avaient non seulement une meilleure longévité par rapport au sauvage, mais aussi une meilleure résistance vis-à-vis d'une infection par des bactéries Gram+ (Garsin *et al.* 2003).

Voies des *Mitogen-Activated Protein* Kinases (MAPK) : p38 MAPK, ERK et JNK

Les voies de transduction du signal *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) sont évolutivement conservées chez les organismes eucaryotes et assurent la transduction des signaux en réponse à une variété de stimuli extracellulaires. Chaque voie est composée de trois classes enzymatiques : les MAPK, les MAPK kinases (MAPKK) et les MAPK kinase kinases (MAPKKK). La transduction du signal a lieu de la manière suivante : les MAPKKK phosphorylent et activent les MAPKK qui en retour phosphorylent et activent les MAPK.

Les classes p38 et JNK de protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK) ont conservé leur rôle évolutif dans le contrôle des réponses cellulaires aux stress microbiens et abiotiques. Chez *C. elegans*, la voie p38 MAPK est nécessaire pour la résistance aux infections microbiennes alors que la voie JNK semble plutôt dévouée à la résistance aux stress induits par les métaux lourds (Kim *et al.* 2004).

Il a été démontré que les MAPKK MKK4 et MKK7 activent JNK (Tournier *et al.* 2001 ; Wada *et al.* 2001), et les MAPKK MKK3 et MKK6 sont les principaux activateurs de p38 MAPK (Han *et al.* 1996 ; Brancho *et al.* 2003). L'analyse génétique chez la souris suggère des rôles distincts non redondants pour MKK4 et MKK7 dans l'activation de JNK en réponse à différents stimuli cellulaires (Tournier *et al.* 2001). Des études similaires sur l'activation de p38 MAPK par MKK3 et MKK6 suggèrent des rôles spécifiques en fonction du tissu cellulaire, mais MKK3, MKK6 et même MKK4 peuvent également fonctionner de manière redondante dans l'activation de p38 MAPK (Brancho *et al.* 2003).

Aujourd'hui, différentes études ont montré que la voie p38 MAPK (NSY-1, SEK-1, PMK-1) n'était pas seulement impliquée dans la réponse antimicrobienne, mais également dans la synthèse de glutathion sous l'impulsion d'un stress oxydatif, du développement neuronal asymétrique en présence de Ca^{2+} (Pastuhov *et al.* 2015).

La voie ERK-MAPK consiste en une cascade de phosphorylations permettant la transduction de signaux depuis la surface cellulaire vers le noyau. Elle permet notamment le contrôle de différents processus biologiques comme la prolifération et la différenciation cellulaires (Nishida and Gotoh 1993 ; L. Chang and Karin 2001). Elle est constituée de 3 kinases : LIN-45 (orthologue à RAF-1), MEK-2 (orthologue à MEK-1/2) et MPK-1 (orthologue à ERK-1/2) permettant l'activation du facteur de transcription SKN-1 comme indiqué Figure 19

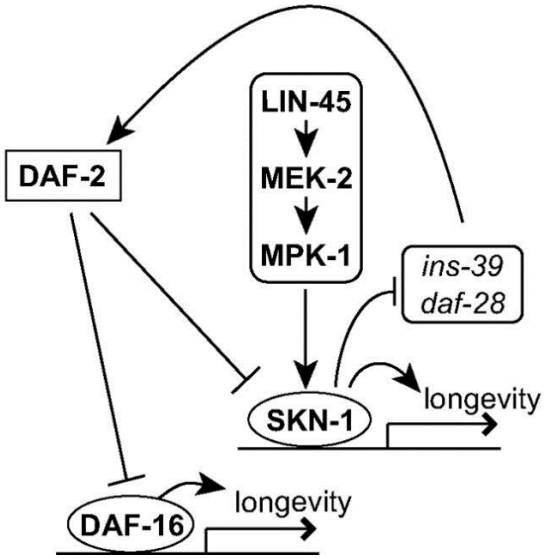


Figure 19 : Voie ERK

(Okuyama *et al.* 2010)

(Okuyama *et al.* 2010). Par ailleurs, des études ont montré que l'activation de la cascade ERK permet la prolongation de la durée de vie de *C. elegans*. En effet, au travers de SKN-1, celle-ci régule la voie de DAF-2/DAF-16 en réprimant l'expression de peptides analogues à l'insuline (ligand de DAF-2) comme *ins-39* ou *daf-28*. De plus, MPK-1 phosphoryle des sites clés sur SKN-1 qui sont requis pour son accumulation dans les noyaux cellulaires. Dans un contexte infectieux, il a été montré que la présence de la bactérie pathogène *Microbacterium nematophilum* entraînait une réponse de l'hôte via la voie ERK. Cette réponse se traduit par un gonflement de la queue du nématode. Cette réaction permet de prévenir une sévère constipation qui causerait un arrêt prématuré de son développement ainsi que sa stérilité (Nicholas and Hodgkin 2004).

La famille des c-Jun N-terminal kinases (JNK), sous-groupe des MAPK, est impliquée dans la transduction du signal lié à l'exposition de stress environnementaux de manière générale. Chez les mammifères, ces kinases sont également activées par des cytokines, comme le facteur de nécrose tumorale (TNF) et l'interleukine 1 (IL-1) (Oh *et al.* 2005).

Ainsi, contrairement à la voie de signalisation DAF-2 / ILR, une activation de la voie JNK se traduit par une déphosphorylation de DAF-16 et donc sa translocation du cytoplasme vers le noyau (Figure 19).

Voie DBL-1/TGF-β

La voie DBL-1/TGF-β, aussi appelé SMA/MAB a été initialement associée à deux phénotypes : les vers de petite taille (*small body size* SMA) et une morphologie anormale de la queue des mâles (*male tail abnormal morphology* MAB). Ces deux phénotypes sont sous la dépendance des gènes *mab-21* et *lon-1* (Morita *et al.* 1999 ; Morita *et al.* 2002). Néanmoins, il a été démontré que cette voie était impliquée dans d'autres fonctions biologiques comme l'immunité, la reproduction, le vieillissement, etc. tout en étant non essentielle à la survie du nématode (Gumienny and Savage-Dunn 2005). De même, les gènes *mab-21* et *lon-1* ne sont pas impliqués dans la réponse immunitaire du nématode, notamment vis-à-vis d'une infection à *Pseudomonas* (Ewbank 2006).

Au contraire de la voie DAF-2/ILR, l'activation de la voie par DBL-1 (Figure 20) entraîne l'expression des gènes cibles. *dbl-1* code pour un facteur de croissance transformant β (TGF-β) reconnu par l'hétérotétramère transmembranaire DAF-4/SMA-6. Il en résulte la phosphorylation et l'activation de trois protéines SMAD : SMA-2, SMA-3 et SMA-4. Contrairement au facteur de transcription DAF-16 présenté précédemment, la phosphorylation de ces protéines entraîne leurs translocations dans le noyau afin d'activer l'expression de

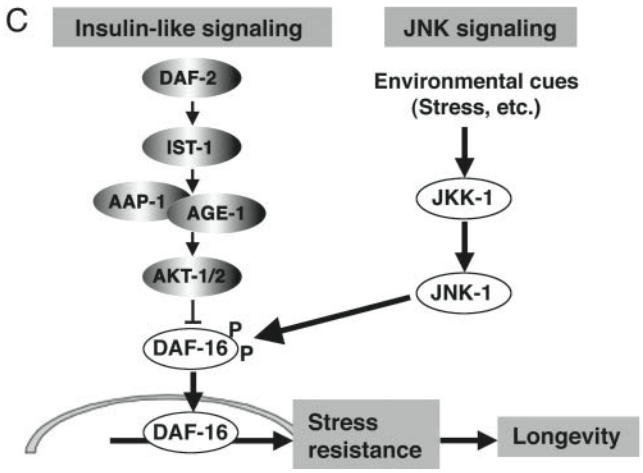


Figure 19 : Interaction entre les voies de signalisation JNK et Insuline-*like*

(Oh *et al.* 2005)

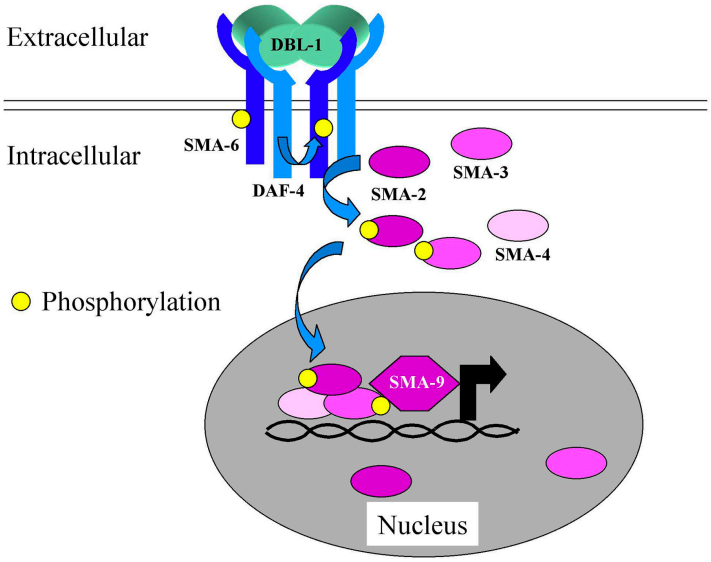


Figure 20 : Voie DBL-1/TGF-β

(Ewbank 2006)

gènes, parfois en association avec les facteurs de transcriptions SMA-9/Schnurri, LIN-31/forkead ou MAB-31 (Gumienny and Savage-Dunn 2005 ; J. Ewbank 2006). Ainsi, l'expression de nombreux gènes codants pour des effecteurs antimicrobiens est régulée par DBL-1 comme des lectines (*clec-85*), des lysozymes (*lys-1*, *lys-7*, *lys-8*) (Alper *et al.* 2007), des lipases (ZK6.7) (Mallo *et al.* 2002), des P-glycoprotéines (*pgp-1*, *pgp-6*) (Liang *et al.* 2007) faisant partie de la famille des transporteurs ABC ou bien des caenacines.

D'après plusieurs études, les gènes *sma-2*, *-3* et *-4* sont nécessaires à la résistance à une infection, simultanément ou non. En effet, dans le cas d'une infection à *P. aeruginosa* P14, les trois sont requis alors que dans le cas de *D. coniospora*, seul *sma-3* est nécessaire (Zugasti and Ewbank 2009).

4.2.3. Les peptides et protéines antimicrobiens

En raison de la diversité de microorganismes que le nématode est amené à rencontrer au cours de sa vie, celui-ci dispose d'une large gamme de protides ayant une activité antimicrobienne (AMPs) (Tableau 8) pour faire face à un potentiel contact avec un pathogène pouvant causer sa mort. En fonction du type d'infection (*i.e.* bactérienne ou fongique), le nématode va adapter sa réponse immunitaire en activant ou en réprimant l'expression des différents gènes d'antimicrobiens.

En plus de la nature du pathogène, la localisation du foyer infectieux a un impact direct sur la réponse antimicrobienne mise en jeu (Figure 22). En effet, lors d'une infection au niveau de l'épiderme, la présence du pathogène induit la synthèse et l'excrétion de protéines du type neuropeptides (NLPs). De plus, le système nerveux du nématode, en réponse à des signaux environnementaux, va synthétiser des signaux solubles, activés en présence du pathogène. Cette activation va conduire à l'excrétion de caenacines (CNCs). Par ailleurs, lors de la présence de pathogènes dans le tractus digestif, d'autres molécules antimicrobiennes seront synthétisées en réponse à des dommages cellulaires comme des défensines (ABFs), des lectines, des caenopores (SPPs) ou bien des lysozymes, tous libérés dans la lumière intestinale.

Caenacines (*cnc*) et protéines de type neuropeptides (*nlp*)

Les familles de protéines analogues aux neuropeptides (NLP) et de caénacines (CNC) sont des peptides antimicrobiens étroitement apparentés sur le plan phylogénétique. Plusieurs gènes *nlp* et *cnc*, tels que *nlp-29*, *nlp-30*, *nlp-31* et *cnc-2* (Couillault *et al.* 2004 ; Pujol *et al.* 2008 ; Zugasti and Ewbank 2009), se sont révélés être exprimés dans l'épiderme du ver correspondant au foyer infection de *D. coniospora*. L'expression de *cnc-2* n'est activée que

Tableau 8 : Aperçu des familles de gènes effecteurs antimicrobiens putatifs chez le nématode *Caenorhabditis elegans*

Adapté de Dierking, Yang, and Schulenburg, 2016.

Gene family	Abbr.	Comment	No. of genes
Caenacins / neuropeptide-like proteins	*cnc/nlp*	Short peptides, rich in glycin and aromatic acid	12
Caenopores	*spp*	SAPLIPs (with saposin domain)	23
Lysozymes	*lys/ilys*	2 lysozyme types (entamoeba- and invertebrate-types)	16
Defensin-like AMPs	*abf*	Sequence homology to insect and mammalian defensins	6
C-type lectin domain-containing proteins	*clec*	Diverse family with C-type lectin domain	283
Fungal-induced peptides and fip-related peptides	*fip/fipr*	Short peptides induced upon fungal exposure	36
Thaumatin-like proteins	*thn*	Homologies to anti-fungal thaumatins from plants	8

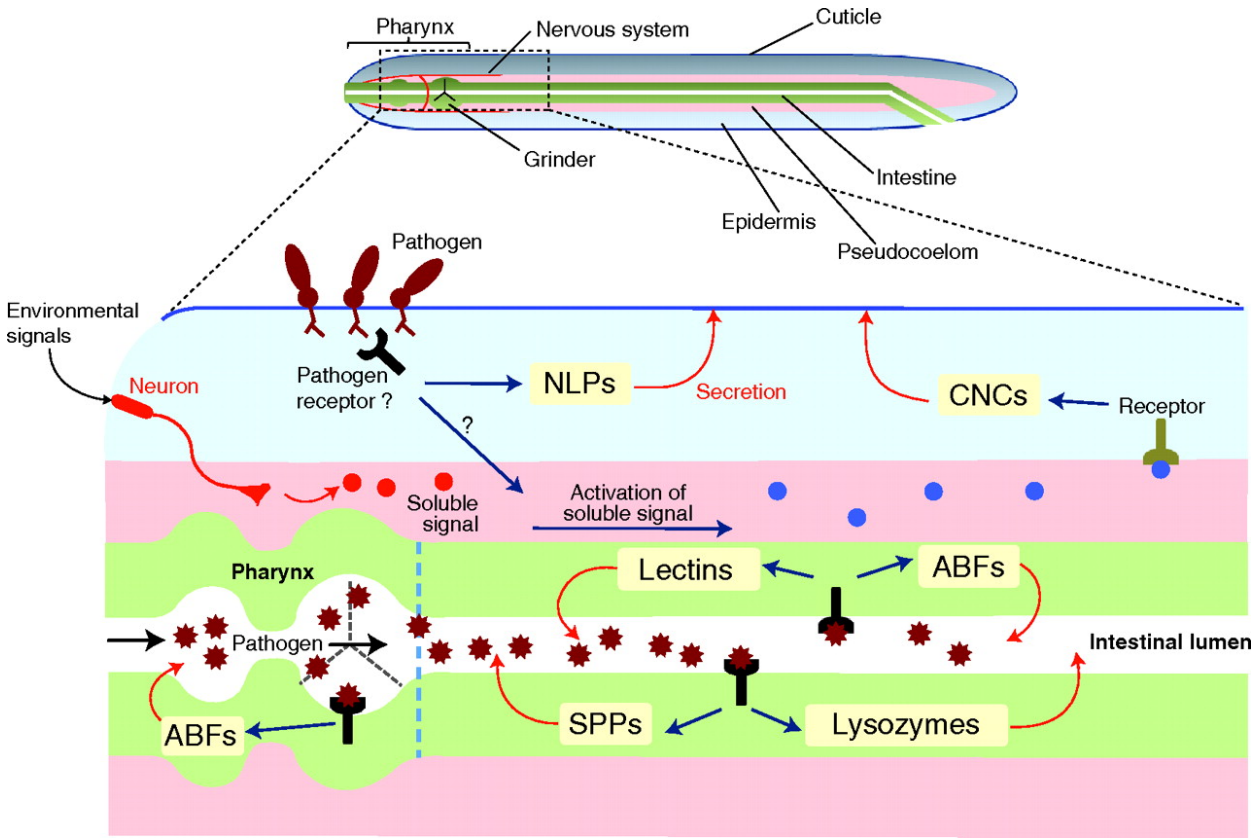


Figure 22 : Pathogènes et antimicrobiens chez *C. elegans*

(Ewbank and Zugasti 2011)

par une infection fongique, tandis que l'expression de *nlp-29* est également induite par une plaie stérile, un stress osmotique ou chez des vers présentant des anomalies épidermiques (Pujol, Cypowyj, *et al.* 2008 ; Pujol, Zugasti, *et al.* 2008 ; Zugasti and Ewbank 2009).

Caenopores (*spp*)

Les cénopores appartiennent à une ancienne famille de peptides antimicrobiens à domaine saposine. Elles partagent des similarités avec les protéines du type saposine (SAPLIPs) comme les lysine NK et granulysine des mammifères (Leippe 1995 ; Leippe 1999). Ils forment une famille de gènes de 23 membres actuellement.

Une analyse très détaillée de la fonction de SPP-5 a été réalisée par Roeder et ses collaborateurs (Mysliwy *et al.* 2010 ; Roeder *et al.* 2010). Ce caenopore est exclusivement exprimé dans l'intestin. Le *knock-out* de *spp-5* par RNAi entraîne un impact négatif sur l'état de santé général du ver (ex. production réduite d'œufs) et la présence très élevée de bactéries *E. coli* OP50 dans l'intestin du nématode (Roeder *et al.* 2010). Ceci suggère que *spp-5* est nécessaire pour tuer les bactéries ingérées en perméabilisant les membranes. Aussi, une analyse fonctionnelle de SPP-1, SPP-3 et SPP-12 a montré qu'ils sont capables de perméabiliser les membranes de différents microorganismes (Murphy *et al.* 2003).

Malgré les connaissances dont nous disposons sur la fonction des SPP au niveau peptidique, la régulation de l'expression des gènes *spp* est beaucoup moins bien comprise. *spp-1* et *spp-12* ont été identifiés en tant que cibles en aval du facteur de transcription FOXO DAF-16 (Murphy *et al.* 2003). Il semble donc que la voie ILR induise l'expression d'au moins certains gènes *spp*. De plus, l'expression de plusieurs gènes *spp* (*spp-1*, *spp-2*, *spp-8*, *spp-15* et *spp-17*) est fortement régulée à la hausse en réponse à *S. aureus* et cette régulation à la hausse nécessite le facteur de transcription HLH-30 (Visvikis *et al.* 2014).

Lysozymes (*lys* et *ilys*)

Les lysozymes sont des protéines enzymatiques ubiquitaires retrouvées chez la plupart des organismes, aussi bien procaryotes, viraux qu'eucaryotes. Ces enzymes sont impliquées dans les processus antibactériens en raison de leur activité hydrolytique visant le peptidoglycane. Dans le cas de *C. elegans*, les lysozymes jouent aussi un rôle dans la digestion des bactéries en participant à leur lyse. Une analyse phylogénétique du génome de *C. elegans* a montré la présence de gènes codant pour deux types de lysozymes : cinq du type invertébré (*ilys*) et dix du type protiste (*lys*) (Schulenburg and Boehnisch 2008). La majorité des gènes sont exprimés au niveau intestinal bien que certains soient préférentiellement exprimés dans les neurones (*lys-1*), les cellules musculaires (*lys-7*) ou le pharynx (*lys-8*).

Peptides antimicrobiens de type défensine (*abf*)

Six gènes codants pour de facteurs antimicrobiens (*abf*) présentant de fortes similarités avec des peptides du type défensine sont présents dans le génome de *C. elegans*. Diverses études ont montré un large spectre d'action du peptide ABF-2 présentant des activités anti-bactéries Gram négatif et anti Gram positif, mais également antifongiques (Kato *et al.* 2002). Les voies régulant l'expression de *abf-2* ne sont pas totalement élucidées et semblent être dépendantes du type d'infection. En effet, dans le cas d'une infection à *S. aureus*, le facteur de transcription HLH-30 est requis (Visvikis *et al.* 2014) tandis que pour *C. neoformans*, celui-ci requiert le récepteur *scavenger* CED-1 (homologue au récepteur humain SCARF1) et C03F11.3 (homologue à CD36) (Means *et al.* 2009). De plus, il s'avère que *abf-1* soit dépendant de l'expression de *npr-1* lors d'une infection à *P. aeruginosa* (Styer *et al.* 2008). Cependant, il s'avère que les autres gènes *abf* ne jouent qu'un rôle limité dans l'immunité puisque leur expression reste insensible à la présence de pathogène.

Famille des lectines de type C (*clec*)

La famille de gènes CLEC est très diverse chez *C. elegans*, comprenant plus de 280 gènes et constituant la septième famille de gènes la plus abondante dans le ver. De plus, l'expression de la majorité des gènes *clec* de *C. elegans* est induite par une infection par un agent pathogène, ce qui montre un schéma de régulation très spécifique. De plus, plusieurs gènes *clec* sont nécessaires pour la résistance à l'infection, comme le démontrent les analyses génétiques fonctionnelles utilisant des souches mutantes ou le RNAi (Pees *et al.* 2016). Cependant, la fonction exacte des protéines CTLD dans l'immunité de *C. elegans* n'est toujours pas claire. À ce jour, une seule étude a évalué la fonction de ces gènes dans le contexte d'une réponse immunitaire au niveau de la protéine, démontrant que les deux protéines CTLD CLEC-39 et CLEC-49 sont capables de se lier à la bactérie pathogène *S. marcescens*

Peptides antifongiques (*fip* et *fipr*)

Deux autres groupes d'effecteurs potentiels sont les peptides induits par les champignons (*fungus-induced peptides fip*) et les peptides apparentés au *fip* (*fipr*). Ces gènes sont induits dans l'expression lors d'une infection par des agents pathogènes fongiques tels que *D. coniospora, Harposporium spp.* et *C. albicans* (Engelmann *et al.* 2011; Pukkila-Worley *et al.* 2011). *Caenorhabditis elegans* possède sept gènes *fip* et 29 gènes *fipr* dont l'expression varie généralement lors de l'exposition à des agents pathogènes. Comme ils codent pour des protéines d'une taille inférieure à 100 acides aminés et qu'il est prédit qu'ils contiennent des peptides signal, il est probable que les gènes *fip* et *fipr* codent pour des AMP. Les preuves

expérimentales de leur contribution à la défense antifongique ou à l'activité antimicrobienne de *C. elegans* sont jusqu'à présent très limitées (Pujol *et al.* 2012).

Cependant, il est nécessaire de s'assurer si les *thn* sont réellement des effecteurs antimicrobiens. De plus, il est possible qu'à l'avenir, d'autres familles de gènes de *C. elegans* possédant une activité antimicrobienne soient découvertes.

4.3. Comment les bactéries lactiques influencent l'immunité chez *C. elegans* ?

La protection d'un organisme contre un agent pathogène, que ce soit un mammifère, un oiseau ou un nématode, implique des voies de signalisation hautement conservées (Troemel *et al.* 2006). Chez *C. elegans*, deux grandes voies de signalisation (Figure 23) sont impliquées dans la réponse immunitaire innée : les voies de la protéine kinase activée par les mitogènes (MAPK) et la voie de signalisation à l'insuline / IGF-1 (ILS) également nommé DAF-2 / récepteur à l'insuline-like (DIR) (Engelmann and Pujol 2010).

C. elegans présente différentes réponses transcriptionnelles selon l'origine de l'infection fongique ou bactérienne (Pukkila-Worley *et al.* 2011 ; Clark and Hodgkin 2014). La présence de la levure *C. albicans* induit la répression des effecteurs antimicrobiens. Les gènes *fil-1* et *clec-71*, codant respectivement pour une lipase et une lectine de type C, sont régulés positivement par *P. aeruginosa* et *S. aureus*, mais pas par *C. albicans*. Les bactéries à Gram positif et à Gram négatif induisent également une réponse distincte, c'est-à-dire qu'en présence de *P. aeruginosa*, il se produira une surexpression des gènes *crp-3* (peptidase), *cyp*-35A2 et *cyp*-35C1 (cytochrome P450) alors qu'en présence de *S. aureus*, les gènes *pmp-1* (transport ABC), *gst-28* (glutathion S-transférase) et *lys-5* (lysozyme) est surexprimée. Il existe une réponse immunitaire commune aux trois genres *Candida*, *Staphylococcus* et *Pseudomonas*, notamment l'induction des gènes *far-7* (*nematode fatty acid retinoid binding*) et de la protéine *cyp*-37B1 (cytochrome P450), tandis que les gènes *sams-1* (S-adénosylméthionine synthétase), *acdh-1* (acyl-CoA déshydrogénase) et *nhr-114* (*ligand binding domain of nuclear hormone receptor*) sont réprimés (Pukkila-Worley *et al.* 2011 ; Clark and Hodgkin 2014). Une autre étude a montré que *nhr-86* induisait des défenses immunitaires innées indépendantes du *pmk-1* (p38 MAPK) en réponse à *P. aeruginosa* (Peterson *et al.* 2019). Enfin, une étude a démontré que la réponse de *C. elegans* à une infection par *B. thuringiensis* présentait des changements significatifs au niveau du protéome, cet effet étant sous l'influence des protéines kinases activées par l'AMP (AMPK), qui sont supposées être des régulateurs de la réponse immunitaire chez le ver (Yang *et al.* 2015). Du fait de la grande

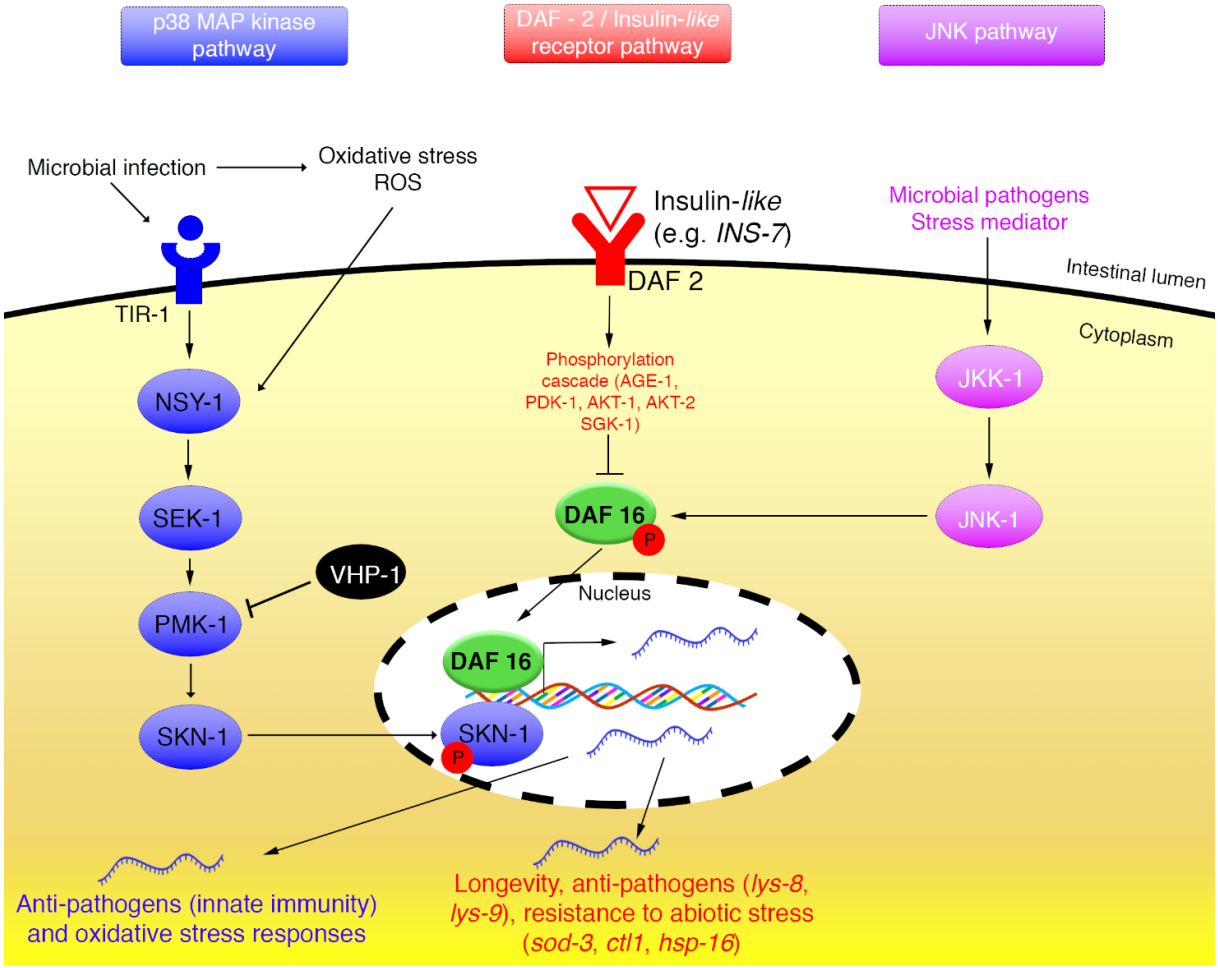


Figure 23 : Les trois grandes voies impliquées dans la réponse immunitaire de *C. elegans* : p38 MAPK, DAF-2 / Insulin-*like* receptor et JNK

conservation des voies de signalisation impliquées dans l'immunité innée d'une espèce à une autre, *C. elegans* pourrait être un outil intéressant pour la caractérisation moléculaire des voies immunitaires.

4.4. Utilisation de *C. elegans* pour étudier les effets antipathogènes des bactéries lactiques

L'ensemble de ce paragraphe est retrouvé en totalité dans l'article de revue (Annexe 1) et est résumé dans le Tableau 9.

Dans la nature, *C. elegans* se rencontre dans de nombreuses niches écologiques et est susceptible d'être l'hôte de levures telles que *Candida* ou de bactéries telles que *Pseudomonas*, *Enterococcus*. (Clark and Hodgkin 2014), *Micrococcus luteus*, *Bacillus megaterium* (Coolon *et al.* 2009) ou *Comamonas aquatica* (MacNeil *et al.* 2013). La plupart des vers ont leur intestin colonisé par des bactéries, en particulier ceux nourris *in vitro* avec *E. coli* OP50, dès l'âge de 2 jours (Portal-Celhay *et al.* 2012).

S. enterica serovar Enteritidis, une entérobactérie pathogène chez l'homme, est capable d'induire une mortalité chez *C. elegans* en quelques jours seulement (40 % en 5 jours) après l'invasion de son intestin. Cependant, les jeunes adultes (3 jours) sont résistants à la fois à la colonisation de leur intestin par *Salmonella* et à sa pathogénicité par rapport aux vers âgés de 5 jours. Une résistance à l'infection a été mise en évidence chez des adultes âgés (7 jours) nourris avec une bactérie probiotique (*L. helveticus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *B. infantis* et *B. longum*) avant l'infection par l'agent pathogène. Il est intéressant de noter que la pathogénicité de *S.* Enteritidis chez le nématode nécessite des bactéries vivantes dans le cas contraire *C. elegans* a une durée de vie assez similaire à celle rencontrée avec *E. coli* OP50. *L. rhamnosus*, *plantarum* et *helveticus* ont été rapportés, offrant une bien meilleure résistance à l'infection à *S. enterica* Enteritidis dans le ver sans limiter sa présence dans l'intestin. Par conséquent, le mécanisme d'inhibition de la virulence de *S.* Enteritidis ne serait pas dû à la synthèse de composés antimicrobiens, mais à une certaine immunotolérance (Ikeda *et al.* 2007). Rangan *et al.* ont montré que l'antigène A SagA sécrété par *Enterococcus faecium* est suffisant pour promouvoir la tolérance aux agents pathogènes de manière dépendante de *tol-1*, protégeant ainsi *C. elegans* contre la pathogenèse de *Salmonella* (Rangan *et al.* 2016). Cette activité protectrice a également été observée chez la souris. Chez les vers nourris d'*E. faecium* L11, il a été démontré que l'expression accrue de gènes liés à la voie MAPK (*pmk-1* et *sek-1*) et à la voie TGF-β (*dbl-1* et *sma-3*) contribuait à la résistance contre l'infection à *Salmonella* (Sim *et al.* 2018). Les lysozymes, tels

Tableau 9 : Interactions pathogènes — bactéries lactiques étudiées dans l'intestin de *C. elegans*

Règne	Pathogènes	Bactéries lactiques	Mécanismes	Références
Bacteria	*S. enterica*	*L. helveticus* *L. plantarum* *L. rhamnosus*	Immunotolérance	Ikeda *et al.* 2007
		B. infantis *B. longum*	Non décrit	Rangan *et al.* 2016
		E. faecium	Non décrit	Sim *et al.* 2018
	P. aeruginosa	*L. brevis* *P. acidilatici* *P. pentosaceus*	Non décrit	Chelliah *et al.* 2018
	S. aureus	*L. plantarum* *L. zeae* *L. casei* *L. rhamnosus*	Non décrit	Park *et al.* 2014
		L. acidophilus	Voies TIR-1, PMK-1 et BAR-1	Kim and Mylonakis 2012
	E. coli (isolats cliniques)	*L. plantarum*	Non décrit	Sharma *et al.* 2018
		L. paracasei	Non décrit	Sharma *et al.* 2019
	ETEC	*L. zeae* *L. casei*	Inhibition de la virulence des *E. coli*	Zhou *et al.* 2014
		L. plantarum *L. rhamnosus*	Non décrit	Heo *et al.* 2018
	EHEC	*E. faecalis*	Inhibition de la virulence	Neuhaus *et al.* 2017
		L. acidophilus	Inhibition de la virulence	Kim *et al.* 2006
	L. pneumophila	*B. infantis*	Voie p38 MAPK	Komura *et al.* 2010
	E. faecalis	*L. acidophilus*	Voies TIR-1, PMK-1 et BAR-1	Kim and Mylonakis 2012
Fungi	*C. albicans*	*L. rhamnosus*	Voies DAF-16, p38 MAPK	Poupet, Saraoui, *et al.* 2019 ; Poupet, Veisseire, *et al.* 2019
		L. paracasei	Inhibition de la filamentation	de Barros *et al.* 2018

que LYS-8 qui est sous le contrôle de *dbl-1* et *sma-3*, et les lectines ont été identifiées comme des peptides antimicrobiens qui contribuent à la défense des nématodes contre l'infection (Millet and Ewbank 2004).

En ce qui concerne la colonisation de l'intestin, la condition préalable pour qu'une souche microbienne soit reconnue comme probiotique (s'il est utilisé par voie orale) est actuellement controversée (Rousseau 2004 ; Nivoliez *et al.* 2012). Bien que le LG2055 ait eu des effets positifs sur le ver et que sa présence dans l'intestin ait été confirmée, il est incapable de le coloniser (Nakagawa *et al.* 2016). Il serait intéressant de suivre la population LG2055 pour préciser si elle constitue une flore transitoire ou si elle est détruite dans le tube digestif. Il a également été démontré que *L. plantarum*, ainsi que *L. zeae* LB1 et *L. casei* CL11, ont été en mesure de coloniser l'intestin de *C. elegans* et de se maintenir, après 5 jours, au-dessus de 4,3 $UFC.mL^{-1}$ par ver (ce qui est supérieur aux 3,2 $UFC.mL^{-1}$ par ver obtenus avec *L. rhamnosus* GG), contribuant ainsi à l'inhibition de *S. aureus* en stimulant le système immunitaire inné, mais les mécanismes sous-jacents ne sont pas clairement définis (Park *et al.* 2014). Une autre étude évaluant 15 souches probiotiques, notamment *L. plantarum* K90 et *L. paracasei* CD4, montrant une augmentation de la durée de vie du nématode, a montré que la capacité de colonisation intestinale diffère entre les souches testées (Sharma *et al.* 2018). La dernière étude de Sharma suggère que les souches probiotiques adhérées inhibent la fixation des souches pathogènes d'*E. coli* sur les cellules intestinales de *C. elegans*, bloquant les sites récepteurs et réduisant la colonisation par des agents pathogènes (Sharma *et al.* 2019). Dans l'étude d'Ikeda *et al.*, les bactéries lactiques n'ont pas été en mesure de réduire la colonisation de l'intestin par l'agent pathogène, ce qui peut indiquer l'absence de synthèse de composés antimicrobiens (Ikeda *et al.* 2007). Cette absence d'inhibition de la colonisation de l'intestin par un agent pathogène a également été démontrée avec *E. coli* entérotoxinogène (ETEC), une souche mortelle pour *C. elegans*, en présence de *L. zeae* LB1 et *L. casei* CL11. Dans le cas présent, la protection du ver par les probiotiques est due à l'inhibition de la synthèse des entérotoxines dont le mécanisme n'est pas encore compris (Zhou *et al.* 2014). Les deux lactobacilles, ainsi que les souches *L. plantarum* JDFM LP11 et *L. rhamnosus* GG (Heo *et al.* 2018) sont capables de coloniser l'intestin du ver et se trouvent à un taux de 10^4 à 10^5 $UFC.ver^{-1}$, soit autant que pour ETEC. La pertinence de la colonisation intestinale, qu'elle soit chez l'Homme ou chez le modèle *C. elegans*, pour une souche probiotique d'exercer son effet optimal doit encore être étudiée.

La souche *E. coli* entérohémorragique (EHEC) O157:H7 présente également une pathogénicité significative pour *C. elegans*, réduisant ainsi sa durée de vie par rapport à une bactérie avirulente. Une étude utilisant le probiotique *E. faecalis* (commercialisé sous le nom

de Symbioflor® (Symbiopharm, Herborn, Allemagne)) a montré qu'*E. faecalis* exerçait un effet protecteur, réduisant de manière significative la mortalité de *C. elegans* due aux EHEC. Un mélange *E. faecalis* - *E. coli* O157:H7 a restauré en partie une durée de vie, mais différente de celle observée avec *E. coli* OP50 ou Symbioflor® seul. Il est intéressant de noter ici la potentialisation de l'effet anti-EHEC de la souche *E. faecalis* par le Symbioflor®, une substance galénique. Cet effet bénéfique d'*E. faecalis* s'explique par le fait que le probiotique régule négativement un grand nombre de gènes associés à la virulence d'*E. coli* O157:H7, tels que *espA*, *espB*, *espD* (codant pour l'élément structural LEE) ou sepQ (protéines formant des pores) (Neuhaus *et al.* 2017). Cependant, les gènes stx1B et stx2B codant pour les sous-unités de la toxine de type Shiga ne sont pas réprimés en présence du probiotique (Neuhaus *et al.* 2017), comme c'est le cas avec *L. acidophilus* (Kim *et al.* 2006). Les auteurs ont émis l'hypothèse que l'inactivation de la toxine peut s'expliquer par le fait que *E. coli* et *E. faecalis* sont lysés par le broyeur du ver et que les fragments d'*E. faecalis* inhibent la fixation des toxines sur les récepteurs cellulaires (Neuhaus *et al.* 2017). Au début de l'infection par *E. coli* entérohémorragique, la voie p38 MAPK, impliquée dans la réponse immunitaire innée, est induite par la toxine Stx-1 (Chou *et al.* 2013).

Dans le cas de *L. pneumophila*, il apparaît que lorsque *C. elegans* adulte est nourri avec *B. infantis* puis exposé à *L. pneumophila*, une résistance significativement accrue à l'agent pathogène a été observée bien que *B. infantis* n'ait pas réduit la quantité d'agent pathogène dans l'intestin. Ce renforcement du système immunitaire impliquerait, comme pour la longévité, le système de signalisation PMK-1 / p38 MAPK (Komura *et al.* 2010).

Dans une autre étude, un isolat clinique de *L. paracasei* a augmenté de 29 % la survie de *C. elegans* infecté par *C. albicans*. Cette longévité prolongée s'est accompagnée de l'inhibition de la filamentation de *C. albicans* ATCC 18804, empêchant la rupture de la cuticule des vers de 27 %. Une régulation négative des gènes *tec1* et *ume6* essentiels à la production d'hyphes a été suggérée pour expliquer la réduction de la filamentation de *C. albicans* (de Barros *et al.* 2018).

De plus, des réponses bactériennes opposées ont été mises en évidence. L'alimentation de *C. elegans* avec *L. acidophilus* aura pour effet de protéger le ver contre les infections à *E. faecalis* et *S. aureus* pathogènes, mais pas contre *P. aeruginosa* (Kim and Mylonakis 2012) qui est une bactérie Gram positive. De même, l'exposition de *C. elegans* à une bactérie à Gram négatif non pathogène, *Pseudomonas mendocina*, aura une action positive contre les infections de l'agent pathogène *P. aeruginosa* PA14 (Clark and Hodgkin 2014). Cette bactérie produit notamment des composés toxiques (phénazines) dont la plus caractérisée est la pyocyanine, toxique pour le ver dû à la génération d'espèces réactives de

l'oxygène (Cezairliyan *et al.* 2013). Toutes ces données montrent que l'effet bénéfique ou délétère d'une bactérie sur *C. elegans* reste dépendant de la souche, ce qui laisse supposer qu'une caractérisation des mécanismes d'interaction est nécessaire. Une question se pose alors concernant ces effets contradictoires d'une même souche pour des applications futures sur la santé humaine.

En conclusion, concernant les effets anti-pathogènes des probiotiques observés chez *C. elegans*, il semble que seule une partie des voies de signalisation ait été caractérisée. De plus, le rôle de la colonisation intestinale des probiotiques dans la résistance aux agents pathogènes n'est pas clairement évalué et dépendrait de la souche. De ce fait, une autre application utilisant le ver serait de tester le potentiel anti-pathogène de consortiums de microorganismes (bactéries et champignons) plutôt que d'un seul microorganisme. Cependant, il convient de rappeler qu'un nombre grandissant d'études sur les interactions entre pathogènes et probiotiques ont été réalisées avec *C. elegans*. De plus, en raison des homologies avec l'Homme, les résultats obtenus peuvent être extrapolés à l'homme, en tenant compte des biais. Par conséquent, le ver représente un modèle pertinent et complémentaire aux modèles *in vitro* et aux essais cliniques puisque les modèles animaux sont peu nombreux et souvent peu adaptés.

5. Conclusion

Les études utilisant *C. elegans* comme modèle *in vivo* dans le but de caractériser le potentiel probiotique de souches bactériennes sont largement axées sur les bactéries lactiques. Les objectifs de ces études concernent l'étude du mode d'action de ces bactéries et ont été appliqués aux interactions hôte-pathogène. Ces études ont été facilitées par la découverte de microbes naturels infectant *C. elegans*, notamment de bactéries, de champignons et de virus. Nombre de ces microbes partagent un site d'infection commun, l'intestin de *C. elegans*, qui est le site d'exposition à de nombreux pathogènes, comme chez les eucaryotes supérieurs. La plupart des études portent sur l'effet anti-pathogène de souches bactériennes qui pourraient être utilisées pour lutter contre les agents pathogènes humains, mais le principal défi consiste maintenant à approfondir la compréhension des mécanismes impliqués dans les capacités antimicrobiennes des microorganismes potentiellement bénéfiques.

La grande majorité de la littérature montre que les bactéries lactiques utilisées comme souches probiotiques exercent des effets extrêmement bénéfiques sur *C. elegans*, que ce soit sur les stress biotiques et abiotiques ou sur l'immunité. Le fait que le ver présente des

similitudes génétiques et physiologiques avec les humains représente une valeur ajoutée par rapport aux stratégies de culture cellulaire *in vitro* visant à étudier les mécanismes moléculaires des probiotiques (LBM ou LBM). *C. elegans* présente un large éventail de perspectives pour explorer les interactions entre les règnes biologiques et résoudre les questions relatives à l'aspect moléculaire de ces interactions. Il représente un outil rapide et peu coûteux pour le criblage des collections de microorganismes en fonction de caractères probiotiques spécifiques. Compte tenu de la liste des avantages et des applications existantes et futures énumérées dans ce chapitre, *C. elegans* représente un moyen puissant et bioéthique de mieux concevoir, voire de remplacer les tests onéreux qui utilisent des animaux comme les rongeurs et comme intermédiaire pertinent des modèles *in vitro* et mammifères. De plus, il apparaît de plus en plus évident qu'avoir recourt à des méthodes intégratives pour étudier des microorganismes d'intérêt est nécessaire. Mêlant approches *in vitro*, *in vivo* et *ex vivo*, les technologiques omiques (génomique, transcriptomique, protéomique, métabolomique, …) ont redéfini la compréhension de la biologie des probiotiques en permettant l'exploration de nouvelles voies de criblages et d'étude de tels microorganismes (Papadimitriou *et al.* 2015).

Néanmoins, il convient de rappeler qu'aucun modèle (*in vitro* ou *in vivo*) ne peut se substituer à la nécessité de mettre en œuvre des essais cliniques qui eux seuls permettent réellement une caractérisation fiable et non biaisée des mécanismes d'action de microorganismes chez l'Homme.

Deuxième partie :

Étude expérimentale

Chapitre 1.

Matériels et méthodes

1. Cultures des souches microbiennes

1.1. Souches microbiennes

Les différentes expériences ont été réalisées sur les souches microbiennes *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35® (biose®, France), *Escherichia coli* OP50 (*Caenorhabditis* Genetic Center, University of Minnesota, USA) et *Candida albicans* ATCC® 10231™ (biose®, France).

1.2. Milieux de culture

La croissance de *L. rhamnosus* Lcr35® est réalisée sur le milieu De Man Rogosa et Sharpe (MRS) soit sous forme de gélose (AES laboratoire, France) (72 heures à 37 °C) ou soit sous forme de bouillon (Fluka Analytical, USA) (24 heures à 37 °C) selon les protocoles. De la même manière, la souche *E. coli* OP50 est cultivé en bouillon Luria-Bertani (LB) (Laboratorios Conda S.A., Espagne) ou sur gélose à l'infusion de cœur-cervelle (BHI) (Biokar diagnostics, France) (24 heures à 37 °C). Enfin, la croissance de *C. albicans* ATCC® 10231™ est réalisée sur le milieu Sabouraud Chloramphénicol également sous forme gélosée ou de bouillon (Biokar diagnostics, France) (48 heures à 37 °C) pour les expériences menées *in vitro*. Pour les expériences *in vivo*, cette croissance est réalisée sur bouillon à l'Extrait de levure, Peptones et Glucose (YPG) ajusté à pH = 6,5 (48 heures à 37 °C ; composition en Annexe 2).

Dans le cas de tests nécessitant des souches bactériennes potentialisées, leurs bouillons de culture sont additionnés de thiosulfate de sodium (STS) à raison 1 g de STS par litre de milieu.

2. Expérimentations *in vitro* : inhibition de la croissance et de la formation de biofilm de *C. albicans*

L'inhibition de la croissance de *C. albicans* par la souche probiotique Lcr35® a été examinée à l'aide de la lignée cellulaire d'adénocarcinome colorectal humain Caco-2 (Pinto *et*

al. 1983). Les cellules Caco-2 ont été cultivées dans le milieu essentiel de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM, Life Technologie, Villebon-sur-Yvette, France) complété par 20 % de sérum de veau fœtal inactivé (Life Technologie) à 37 °C sous 5 % de CO_2. Pour les tests, les cellules ont été ensemencées à une concentration de $3{,}5.10^5$ cellules.puits^{-1} dans des plaques à 24 puits (Dutscher, Brumath, France) et placées dans des conditions de croissance pendant 24 h. Les souches Lcr35® et *C. albicans* ont été cultivées selon Nivoliez *et al.* (2012).

Approche préventive

Après croissance, le milieu de culture cellulaire a été retiré et remplacé par 1 mL de DMEM et 250 µL de culture Lcr35® (10^8 UFC.mL^{-1}) dans chaque puits et incubé pendant 24 h. Deux cent cinquante microlitres de culture de *C. albicans* à différentes concentrations (10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6 et 10^7 UFC.mL^{-1}) ont été ajoutés à chaque puits. Après une incubation de 24 et 48 h, l'inhibition de *C. albicans* par Lcr35® a été évaluée. 100 microlitres de suspension ont été prélevés dans chacun des puits et le nombre de bactéries et/ou de levures viables a été déterminé en étalant des dilutions en série des suspensions sur géloses MRS ou Sabouraud. Pour la mesure de la formation de biofilm de *C. albicans*, après une incubation de 48 h, les puits ont été lavés deux fois avec 0,5 mL de PBS et les cellules ont été récoltées avec 1 mL de trypsine à 37 °C. Comme pour le test d'inhibition, le nombre de bactéries et/ou de levures viables a été déterminé en étalant des dilutions en série des suspensions sur géloses MRS ou Sabouraud. Les milieux ont été incubés à 37 °C pendant 72 h (MRS) ou 48 h (Sabouraud). Chaque test a été effectué trois fois indépendamment et contenait deux répétitions techniques.

Approche curative

Après croissance, le milieu de culture cellulaire a été retiré et remplacé par 1 mL de DMEM et 250 µL de culture de *C. albicans* (10^7 UFC.mL^{-1}) dans chaque puits et incubé pendant 24 h. Lcr35® (250 µL de culture (10^8 UFC.mL^{-1})) a été ajouté dans chaque puits et incubé pendant 48 h. L'inhibition de *C. albicans* par Lcr35® a été évaluée pendant (24 h) et après la co-incubation (48 h). Pour la mesure de la formation de biofilm de *C. albicans*, après une incubation de 48 heures, les puits ont été lavés deux fois avec 0,5 mL de PBS et les cellules ont été récoltées avec 1 mL de trypsine à 37 °C. Les dénombrements ont été réalisés comme décrit dans le paragraphe relatif à l'approche préventive. Chaque essai, effectué trois fois indépendamment, contenait deux répétitions techniques.

3. Expérimentations *in vivo*

3.1. Culture du nématode *Caenorhabditis elegans*

3.1.1. Souches de *C. elegans*

L'ensemble des souches de nématodes utilisées ont été obtenues auprès du *Caenorhabditis Genetic Center* de l'Université du Minnesota (Minneapolis, USA). Le nom des souches, leurs génotypes ainsi que les conditions de croissance sont indiqués dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Liste des souches de *Caenorhabditis elegans*

Nom de la souche	Génotype	Caractéristique	Température pour l'entretien	Température pour les expérimentations
N2	Sauvage		20 °C	20 °C
TJ356	zIs356 IV [*daf -16p* : : *daf -16a/b* : : GFP + *rol-6*(su1006)]	Fluorescent DAF-16 : : GFP Croissance et reproduction lentes	20 °C	20 °C
AU37	*glp-4*(bn2) I; *sek-1*(km4) X.	Stérile à température ambiante Sensible aux pathogènes (voie p38 MAPK)	15 °C	20 / 25 °C
GR1307	*daf-16*(mgDf50) I	Pas d'expression de *daf-16*	20 °C	20 °C
CB1370	*daf-2*(e1370) III	Temperature sensitive dauer constitutive. Maintain at 15C. 100% dauers at 25C. 15% dauer formation at 20C. Long-lived. M-MATING+LOW TEMPERATURE ONLY	15 °C	15 °C
LG333	*skn-1*(zu135) IV; geIs7	Mutation sur le facteur de transcription *skn-1* (voie p38 MAPK)	20 °C	20 °C
VC8	*jnk-1*(gk7) IV.	Mutation sur le gène *jnk-1* (voie JNK)	20 °C	20 °C
KU4	*sek-1*(km4) X.	Mutation sur le gène *sek-1* (voie p38 MAPK)	20 °C	20 °C

3.1.2. Maintenance des nématodes

Le maintien et la croissance des nématodes sont réalisés sur milieu gélosé *Nematode Growth Medium* (NGM) enrichi dont la composition est donnée en Annexe 2. Pour cela, 100 µL de culture d'*E. coli* OP50 en bouillon LB sont étalés à la surface de la gélose à l'aide d'un râteau puis incubés à 37 °C pendant 24 heures.

Les nématodes sont récoltés à l'aide de 5 mL de tampon M9 et transféré dans un tube à fond conique de 50 mL et centrifugé pendant 2 minutes à 1500 rpm. Le culot est ensuite transféré sur les géloses NGM précédemment ensemencées avec *E. coli* OP50 en prenant

soin de les faire refroidir à température ambiante. Les nématodes sont alors incubés à 20 °C, sauf mention contraire indiquée dans le Tableau 10

3.1.3. Synchronisation

Les différences d'âge au sein d'une population de vers sont une source de biais très important pouvant entraîner une grande variabilité dans la réponse de l'animal vis-à-vis du traitement expérimental appliqué. En effet, l'état physiologique de l'animal évoluant de manière significative avec l'âge, il peut, par exemple, se montrer davantage résistant à une infection à un certain stade alors qu'il peut posséder une susceptibilité accrue ultérieurement.

En pratique, il est nécessaire de réaliser une synchronisation à partir d'une population contenant soit des œufs libérés sur le milieu de culture, soit des adultes gravides. Ceux-ci sont récoltés avec du tampon M9 à raison de 5 mL par boîte de Pétri. La suspension obtenue est centrifugée à 1500 rpm pendant 2 minutes puis le surnageant est délicatement retiré. Cinq mL de *Worm Bleach* (2,5 mL de tampon M9, 1,5 mL d'eau de Javel et 1 mL d'hydroxyde de sodium 5N) sont ajoutés au culot. L'ensemble est vigoureusement mélangé au vortex pendant 3 minutes ou jusqu'à la rupture de l'intégrité de la cuticule du ver (i.e. les vers sont lysés). L'action de l'eau de Javel est stoppée par ajout de 40 mL de tampon M9 suivi d'une agitation par retournement. La suspension d'œufs est ensuite lavée deux fois par centrifugation à 1500 rpm pendant 2 minutes, le surnageant étant retiré délicatement et remplacé par 20 mL de tampon M9. Les œufs sont incubés pendant 24 heures à 25 °C sous agitation douce afin de permettre leur éclosion. Le M9 ne contenant aucune source nutritive pour les nématodes, ceux-ci verront leur développement stoppé au premier stade larvaire (L1). Une fois éclos, les larves sont transférées sur milieu NGM préalablement ensemencé avec *E. coli* OP50 (100 µL par boîte, incubation à 37 °C pendant 24 heures) et incubé à 20 °C pendant 48 heures afin qu'ils atteignent le stage L4 / jeune adulte (72 heures pour la souche TJ356).

3.1. Préparation des géloses contenant les souches microbiennes

Une fois les souches microbiennes cultivées dans leurs bouillons respectifs, celles-ci sont centrifugées (4000 rpm pendant 15 minutes) et lavées avec du tampon M9 afin d'obtenir des suspensions à 100 $mg.mL^{-1}$ de microorganismes. Cent microlitres de suspension de Lcr35® ou d'*E. coli* OP50 (100 $mg.mL^{-1}$) ont été étalés sur des géloses NGMY + 0,12 mM FUdR et incubés à 37 °C pendant une nuit. Concernant *C. albicans*, 100 µL de suspension ont été étalés sur des géloses cœur cervelle (BHI) (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) + 0,12 mM de FUdR et incubés à 37 °C pendant une nuit.

3.2. Évaluation de la croissance de *C. elegans*

La quantité ainsi que la qualité de la source nutritive sont des paramètres ayant une grande influence sur la physiologie du nématode affectant aussi bien la vitesse de croissance que sa taille. Pour cela, après avoir atteint le stade L4, les vers sont transférés sur des boîtes de NGMY préalablement ensemencées avec la souche probiotique Lcr35® ou *E. coli* OP50 comme contrôle, et leurs tailles ont été mesurées quotidiennement pendant trois jours. La longueur du corps du ver a été déterminée à l'aide du logiciel ImageJ comme décrit par Mörck et Pilon (Mörck and Pilon 2006) et comparée aux vers alimentés par *E. coli* OP50. Au moins 10 nématodes par expérience ont été imagés dans au moins trois expériences indépendantes.

Les vers adultes individuels ont été photographiés à l'aide d'un microscope Evos FL (Invitrogen, Eugene, USA, grossissement 10X).

3.3. Évaluation de la longévité de *C. elegans*

Les vers L4 ont été transférés sur NGMY avec 0,12 mM de 5— fluorodésoxyuridine FUdR (Sigma, Saint-Louis, États-Unis) pour éviter l'éclosion des œufs et ensemencés avec 100 μL de souche microbienne à 100 mg.mL^{-1} (~ 50 vers par boîte) comme indiqué précédemment. Les boîtes ont été conservées à 20 ° C et les vers vivants ont été comptés chaque jour jusqu'à la mort de tous les animaux. Un animal était considéré comme mort lorsqu'il ne réagissait pas à une stimulation mécanique douce. Cet essai a été réalisé sous forme de trois expériences indépendantes avec trois boîtes par condition.

3.4. Effets de *L. rhamnosus* Lcr35® sur la candidose

Une alimentation séquentielle avec Lcr35® ou *E. coli* OP50 et *C. albicans* a été induite chez *C. elegans*. En tant que groupe témoin, une contamination monotypique a été induite chez *C. elegans* par inoculation avec seulement *C. albicans*, Lcr35® ou *E. coli* OP50.

Étude de survie : approche préventive

Le test de survie a été réalisé conformément aux travaux de de Barros (de Barros *et al.* 2018), avec quelques modifications. Au cours d'un traitement préventif, les jeunes adultes ont été placés sur des géloses contenant Lcr35® à 20 °C pendant différents temps (2, 4, 6 et 24 h). Ensuite, les vers ont été lavés avec du tampon M9 pour éliminer les bactéries avant d'être placés sur des géloses contenant *C. albicans* pendant 2 h à 20 °C. Les nématodes infectés ont été lavés à l'aide d'un tampon M9 avant d'être transférés dans une plaque de microtitration à 6 puits (environ 50 vers par puits) contenant 2 mL de BHI / M9 (20 % / 80 %)

+ milieu de dosage liquide FUdR à 0,12 mM par puits et incubé à 20 °C. Pour les groupes témoins (c'est-à-dire, *E. coli* OP50 + *C. albicans*, uniquement *E. coli* OP50, Lcr35® uniquement et *C. albicans* uniquement), les vers ont été traités de la même manière. Les nématodes étaient observés quotidiennement et étaient considérés comme morts lorsqu'ils ne répondaient pas à une stimulation mécanique douce. Cet essai a été réalisé sous forme de trois expériences indépendantes contenant trois puits par condition.

Étude de survie : approche curative

Pour la réalisation du test en condition curative, le même protocole a été utilisé à l'exception que les nématodes ont d'abord été mis en présence de *C. albicans* avant d'être transféré sur les géloses contenant Lcr35® ou *E. coli* OP50.

3.5. Étude de la présence de *C. albicans* dans l'intestin du ver

Approche préventive

Pour étudier la colonisation de l'intestin du ver par l'agent pathogène *C. albicans*, une coloration fluorescente de la levure a été réalisée. La levure a été colorée à la rhodamine 123 (Yeast Mitochondrial Stain Sampler Kit, Invitrogen), conformément aux instructions du fabricant. Une culture fraîche de *C. albicans* a été réalisée dans un bouillon de YPG comme décrit précédemment, 1,6 µL de rhodamine 123 à 25 mM a été ajouté à 1 mL de suspension de *C. albicans* et incubé à température ambiante à l'obscurité pendant 15 min. Le colorant en excès a été éliminé par centrifugation (14 000 tr / min pendant 5 min à 4 °C) (centrifugeuse Beckman J2-MC, Beckman Coulter, Brea, USA) et lavé avec 1 mL de tampon M9. Par la suite, les nématodes ont été nourris avec *E. coli* OP50 ou Lcr35® sur NGMY pendant 4 h, puis avec *C. albicans* marqué sur gélose BHI pendant 72 h. Les nématodes ont ensuite été visualisés à l'aide d'un microscope à fluorescence à un grossissement de 100X (Evos FL, Invitrogen).

Approche curative

La levure a été colorée au DAPI (Thermo Scientific, Karlsruhe, Allemagne) conformément aux instructions du fabricant. Une culture fraîche de *C. albicans* a été réalisée dans un bouillon de YPG comme décrit au paragraphe 2.1., 10 µL de DAPI à 300 nM ont été ajoutés à 1 mL de suspension de *C. albicans* et incubés à température ambiante à l'obscurité pendant 15 minutes. Le colorant en excès a été éliminé par centrifugation (14 000 rpm pendant 5 minutes à 4 °C) (centrifugeuse Beckman J2-MC, Beckman Coulter, Brea, USA) et lavé avec 1 mL de tampon M9. Par la suite, les nématodes ont été nourris sur *C. albicans* marqué sur des géloses BHI pendant 72 h, puis sur *E. coli* OP50 ou Lcr35® sur des géloses NGMY

pendant 24 h. Les nématodes ont ensuite été visualisés à l'aide d'un microscope à fluorescence à un grossissement de 100X (Evos FL, Invitrogen).

3.6. Étude du transcriptome de *C. elegans*

3.6.1. Extraction des ARN

Afin de pouvoir quantifier l'expression de gènes chez *C. elegans*, une extraction des ARN du ver doit être effectuée. Cette extraction est réalisée sur 10 000 vers en utilisant la méthode au TRIzol. Ces vers sont mis en présence de 500 µL de TRIzol dans un tube contenant des microbilles de verre (PowerBead Tubes Glass 0.1 mm, Mo Bio Laboratories, USA) puis lysés à l'aide du Precellys® 24 (Bertin instruments, France) en effectuant deux cycles de 30 secondes. Le tube est centrifugé puis le surnageant est transféré dans 100 µL de chloroforme et incubé à température ambiante pendant 3 minutes. Le mélange est centrifugé à 12 000 rpm pendant 12 minutes à 4 °C (centrifugeuse Eppendorf 5430 R, Eppendorf, Allemagne) et le surnageant incolore est transféré dans un nouveau tube Eppendorf afin d'être traité une seconde fois au chloroforme.

Le second surnageant incolore est mis en présence de 250 µL d'isopropanol et incubé à température ambiante pendant environ 4 minutes puis centrifugé à 12 000 rpm pendant 10 minutes à 4 °C. Le surnageant est éliminé délicatement et les ARN sont précipités en ajoutant 1 000 µL d'éthanol à 70 % (Sigma, USA). Le précipité centrifugé à 14 000 rpm pendant 5 minutes à 4 °C puis séché à l'air libre avant d'être dissous dans 20 µL d'eau RNase-free.

La quantité d'ARN obtenue est dosée en utilisant par NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, USA). Les échantillons sont stockés à -80 °C jusqu'à utilisation.

3.6.2. Analyse transcriptomique ciblée

3.6.2.1. Reverse transcription des ARN en ADNc

Les ARN extraits sont traités par réverse transcription dans le but d'obtenir une banque d'ADNc. Cette réverse transcription est réalisée au moyen du kit « High-Capacity cDNA Archive kit » (Applied Biosystems, USA). La réaction de polymérisation est effectuée en tube de 0,2 mL dont la composition est la suivante :

- Tampon 10X : 5 µL
- dNTP 25X : 2 µL
- Random primers 10X : 5 µL
- Reverse transcriptase : 2.5 µL
- ARN : 0,5 à 2 µg qsp 35,5 µL d'eau.

Cette réverse transcription est effectuée en thermocycleur 3Prime (TECHNE®, Royaume-Uni) selon le programme H2O2 (10 minutes à 25 °C suivis par 120 minutes à 37 °C).

La quantité d'ADNc obtenue est dosée par NanoDrop puis les échantillons sont stockés à -80 °C jusqu'à utilisation.

3.6.2.2. PCR quantitative

Afin d'étudier le niveau d'expression de gènes d'intérêt chez *C. elegans* en fonction des conditions expérimentales appliquées, une PCR quantitative (qPCR) est réalisée sur l'ADN complémentaire issue de la réverse transcription des ARN messagers extraits.

Chaque échantillon est composé de la manière suivante :

- 6,25 μL de mix qPCR (Rotor Gene® SYBR® Green PCR kit)
- 1,25 μL d'amorces sens
- 1,25 μL d'amorces anti-sens
- 1,25 μL d'eau
- 2,5 μL d'ADN complémentaire (ou d'eau pour le contrôle négatif NTC).

Un triplicat sera réalisé pour chaque échantillon. La réaction de PCR ainsi que le suivi de l'amplification seront effectués au moyen du thermocycleur Rotor Gene Q Qiagen selon le programme suivant :

- 4 minutes à 94 °C
- 30 secondes à 94 °C
- 30 secondes à la Tm
- 60 secondes à 72 °C

} répété 35 fois

- Gradient de température : 65 à 95 °C

Les séquences des amorces permettant le ciblage des fragments de gènes à amplifier, que ce soient des gènes de ménages avec un niveau d'expression constant au cours du temps que des gènes d'intérêts sont renseignées dans le Tableau 11. Les amorces ont été fournies par Eurogentec (Eurogentec, Seraing, Belgique).

Tableau 11 : Séquences des oligonucléotides utilisés comme amorces en PCR quantitative

Nom du gène	Type de gène	Séquences des amorces sens (F) et antisens (R)	Numéro d'accession	Ref.
cdc-42	Référence	F : ATCCACAGACCGACGTGTTT R : GTCTTTGAGCAATGATGCGA	R07G3.1	Semple *et al.* 2010
Y45F10D.4	Référence	F : CGAGAACCCGCGAAATGTCGGA R : CGGTTGCCAGGGAAGATGAGGC	Y45F10D.4	Hoogewijs *et al.* 2008
daf-2	Intérêt	F : AAAAGATTTGGCTGGTCAGAGA R : TTTCAGTACAAATGAGATTGTCAGC	Y55D5A.5	Nakagawa *et al.* 2016
daf-16	Intérêt	F : TTCAATGCAAGGAGCATTTG R : AGCTGGAGAAACACGAGACG	R13H8.1	Nakagawa *et al.* 2016
sek-1	Intérêt	F : GCCGATGGAAAGTGGTTTTA R : TAAACGGCATCGCCAATAAT	R03G5.2	Nakagawa *et al.* 2016
pmk-1	Intérêt	F : CCGACTCCACGAGAAGGATA R : AGCGAGTACATTCAGCAGCA	B0218.3	Nakagawa *et al.* 2016
abf-2	Intérêt	F : TCGTCCGTTCCCTTTTCCTT R : CCTCTCTTAATAAGAGCACC		Poupet, Saraoui, *et al.* 2019
fipr-22/23	Intérêt	F : CCCAATCCAGTATGAAGTTG R : ATTTCAGTCTTCACACCGGA		Poupet, Saraoui, *et al.* 2019
cnc-4	Intérêt	F : ATGCTTCGCTACATTCTCGT R : TTACTTTCCAATGAGCATTC		Poupet, Saraoui, *et al.* 2019

Les séquences des amorces ciblant les gènes *abf-2*, *firp-22*, *fipr-23* et *cnc-4* ont été déterminées *in silico* à l'aide d'un script Perl / BioPerl présenté en Annexe 3. Pour les gènes *fipr-22* et *fipr-23*, une analyse bioinformatique a montré une très forte similarité entre les séquences des deux gènes (96 % d'identité). Par conséquent, il n'est pas possible de différencier les deux gènes par RT-PCR quantitative.

3.6.3. Analyse transcriptomique exhaustive par *Next Generation Sequencing*

3.6.3.1. *Traitement à la DNase I*

Afin de réaliser une analyse transcriptomique par séquençage, il est nécessaire d'effectuer au préalable un traitement à la DNase I dans le but d'éliminer une éventuelle contamination par l'ADN génomique. Ce traitement est réalisé à l'aide du kit Ambion (Invitrogen).

Pour cela, 10 µg d'ARN total repris dans 10 µL d'eau RNase-free sont mélangés à 5 µL de tampon 10X, à 35 µL d'eau RNase-free et à 0,5 µL de DNase I. Les échantillons sont ensuite incubés pendant 30 minutes à 37 °C. 0,5 µL de DNase I sont à nouveau ajoutés dans le but de réaliser un traitement rigoureux. Une nouvelle incubation à 37 °C pendant 30 minutes est ensuite réalisée.

Enfin, la DNase I est inactivée en ajoutant 5 µL de DNase Inactivation Reagent préalablement resuspendu par vortex. Les échantillons sont incubés pendant 2 minutes à température ambiante et sont vortexés 2 à 3 fois. Ils sont ensuite centrifugés à 10 000 rpm pendant 2 minutes à 4 °C. Le surnageant est ensuite récupéré et conservé à -80 °C jusqu'à utilisation.

3.6.3.2. *Séquençage des ARN messagers*

Les ARN messages ont été analysés à l'aide d'un séquenceur Illumina HighSeq 2500 par la technique SBS (*Sequence By Synthesis*). Il s'agit ici d'un séquençage orienté *single read 50 nucleotides*. La préparation des librairies, le séquençage, le prétraitement informatique ainsi que l'analyse de l'expression différentielle ont été réalisés par la plateforme Montpellier GenomiX (MGX).

3.6.3.3. *Analyse fonctionnelle par Gene Ontology*

À partir des gènes différentiellement exprimés de manière significative (*p-value* ajustée inférieure à 0,05), une analyse Gene Ontology a été réalisée. Pour cela, les gènes ont été triés en fonction de leur expression (sous-expression ou surexpression) et selon que les vers étaient en contact avec une seule souche microbienne ou une culture séquentielle. Les listes obtenues ont alors été analysées à l'aide du package R topGO (Alexa and Rahnenfuhrer 2019). Trois niveaux d'analyses ont été considérés : biological process, molecular function et cellular component. Seuls les GO termes significativement enrichichis (test de Fisher, $p < 0,05$) ont été retenus et représentés graphiquement à l'aide de l'interface en ligne WEGO (http://wego.genomics.org.cn/).

3.7. Localisation cellulaire du facteur de transcription DAF-16

L'étude de la localisation cellulaire du facteur de transcription DAF-16 a été réalisée selon Fatima *et al.* (2014) à l'aide de la souche transgénique TJ356 exprimant de manière constitutive DAF-16 :: GFP. Une fois adultes, les vers ont été exposés transférés sur géloses NGM contenant *E. coli* OP50 ou Lcr35® ou sur géloses BHI contenant *C. albicans*. Ceux-ci ont été incubés pendant 2, 4, 6, 24 et 76 heures à 20 °C. En parallèle, une approche préventive a

été réalisée. Pour cela, les nématodes ont été traités par *E. coli* OP50 ou Lcr35® pendant 4 heures à 20 °C sur gélose NGM puis infectés par *C. albicans* sur gélose BHI pendant 2 heures à 20 °C. Par la suite, les nématodes ont été photographiés 2, 4, 6 et 24 heures après l'infection.

La translocation du facteur de transcription DAF-16 :: GFP a été déterminée en évaluant l'accumulation de GFP dans les noyaux cellulaires de *C. elegans* par microscopie à fluorescence (Evos FL, Invitrogen) au grossissement x40.

4. Analyses statistiques

Les données de survie de *C. elegans* ont été modélisées par la méthode de Kaplan-Meier et les différences ont été analysées à l'aide du test du log-rank à l'aide du logiciel R version 3.5.0 et des packages *survival* et *survminer*.

En ce qui concerne l'inhibition de la croissance de *C. albicans*, de la formation de biofilm, la croissance de *C. elegans* et l'expression des gènes analysés par RT-PCR quantitative, les différences entre les conditions ont été déterminées par une analyse de variance (2-way ANOVA) suivi par le test post-hoc de différence significative minimale (LSD) de Fisher à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 7.0a pour Mac OS X (GraphPad Software, La Jolla, California, USA).

Une *p*-value inférieure à 0,05 sera considérée comme significative.

Chapitre 2.

Études des propriétés préventives de Lcr35®

La récurrence accrue des infections à *C. albicans* est associée à une plus grande résistance aux médicaments antifongiques. Cela implique la mise en place de protocoles thérapeutiques alternatifs, tels que les live biotherapeutic microorganisms dont le potentiel antifongique a déjà été démontré à l'aide de modèles précliniques (cultures cellulaires, animaux de laboratoire). Comprendre les mécanismes d'action des microorganismes probiotiques est devenu un besoin stratégique pour le développement de nouveaux traitements pour l'Homme. Ici, nous avons étudié les propriétés prophylactiques anti-*C. albicans* de *L. rhamnosus* Lcr35® en utilisant le modèle cellulaire *in vitro* Caco-2 et le modèle *in vivo C. elegans*. Dans les cellules Caco-2, nous avons montré que la souche Lcr35® inhibait de manière significative la croissance (~ 2 $\log_{10}$ UFC.mL^{-1}) et l'adhésion (150 à 6300 fois moins) de l'agent pathogène. De plus, Lcr35® exerce une activité prolongévité chez le nématode (+ 42,9 %, $p = 3{,}56.10^{-6}$), et protège l'animal de l'infection fongique (+ 267 % de survie, $p < 2.10^{-16}$) même si la levure est toujours détectable dans son intestin. Au niveau mécanistique, nous avons observé en présence de Lcr35® la répression des gènes de la voie de signalisation p38 MAPK et des gènes codant pour des molécules antifongiques, suggérant que l'agent pathogène ne semble plus être détecté par le système immunitaire du ver. Cependant, le facteur de transcription DAF-16 / FOXO, impliqué dans la longévité et la réponse antipathogène de *C. elegans*, est mobilisé par Lcr35®. Ces résultats suggèrent que la bactérie agit en stimulant son hôte via DAF-16, mais également en supprimant la virulence de l'agent pathogène.

Ce travail a donné lieu à une publication dans une revue internationale à comité de lecture.

Lactobacillus rhamnosus Lcr35 as an effective treatment for preventing _Candida albicans_ infection in the invertebrate model _Caenorhabditis elegans_: first mechanistic insights

Cyril Poupet, Taous Saraoui, Philippe Veisseire, Muriel Bonnet, Caroline Dausset, Marylise Gachinat, Olivier Camarès, Christophe Chassard, Adrien Nivoliez, Stéphanie Bornes

PLOS One (2019)

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216184

PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

Lactobacillus rhamnosus Lcr35 as an effective treatment for preventing *Candida albicans* infection in the invertebrate model *Caenorhabditis elegans*: First mechanistic insights

Cyril Poupet[1]*, Taous Saraoui[1], Philippe Veisseire[1], Muriel Bonnet[1], Caroline Dausset[2], Marylise Gachinat[1], Olivier Camarès[1], Christophe Chassard[1], Adrien Nivoliez[2], Stéphanie Bornes[1]

1 Université Clermont Auvergne, INRA, VetAgro Sup, Aurillac, France, **2** Biose Industrie, Aurillac, France

* cyril.poupet@uca.fr

Check for updates

OPEN ACCESS

Citation: Poupet C, Saraoui T, Veisseire P, Bonnet M, Dausset C, Gachinat M, et al. (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): e0216184. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216184

Editor: Ilse D. Jacobsen, Leibniz Institute for Natural Products Research and Infection Biology-Hans Knoell Institute, GERMANY

Received: April 12, 2019

Accepted: October 22, 2019

Published: November 6, 2019

Copyright: © 2019 Poupet et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This work was supported by the European funds FEDER and the Auvergne-Rhône-Alpes Region in the form of grants to CP, as well as biose, as part of the doctoral thesis of CP. The funder biose provided support in the form of salaries for authors CD and AN. The specific roles

Abstract

The increased recurrence of *Candida albicans* infections is associated with greater resistance to antifungal drugs. This involves the establishment of alternative therapeutic protocols, such as probiotic microorganisms whose antifungal potential has already been demonstrated using preclinical models (cell cultures, laboratory animals). Understanding the mechanisms of action of probiotic microorganisms has become a strategic need for the development of new therapeutics for humans. In this study, we investigated the prophylactic anti-*C. albicans* properties of *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35® using the *in vitro* Caco-2 cell model and the *in vivo Caenorhabditis elegans* model. In Caco-2 cells, we showed that the strain Lcr35® significantly inhibited the growth (~2 log CFU.mL^{-1}) and adhesion (150 to 6,300 times less) of the pathogen. Moreover, in addition to having a pro-longevity activity in the nematode (+42.9%, $p = 3.56.10^{-6}$), Lcr35® protects the animal from the fungal infection (+267% of survival, $p < 2.10^{-16}$) even if the yeast is still detectable in its intestine. At the mechanistic level, we noticed the repression of genes of the p38 MAPK signalling pathway and genes involved in the antifungal response induced by Lcr35®, suggesting that the pathogen no longer appears to be detected by the worm immune system. However, the DAF-16/FOXO transcription factor, implicated in the longevity and antipathogenic response of *C. elegans*, is activated by Lcr35®. These results suggest that the probiotic strain acts by stimulating its host via DAF-16 but also by suppressing the virulence of the pathogen.

1 Introduction

Candida albicans is a commensal yeast found in the gastrointestinal and urogenital tracts [1,2] and is responsible for various diseases ranging from superficial infections affecting the skin to life-threatening systemic pathologic states i.e., candidemia [3]. Its pathogenicity is based on

of these authors are articulated in the 'author contributions' section. The funders did not otherwise have any role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have read the journal's policy and the authors of this manuscript have the following competing interests: Adrien Nivoliez (AN) and Caroline Dausset (CD) had an institutional affiliation with the company biose, which manufactures Lcr35 products. The doctoral thesis of Cyril Poupet (CP) is partially financed by the company biose. This does not alter our adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials. There are no patents, products in development or marketed products to declare.

several factors, such as the formation of biofilms, thigmotropism, adhesion and invasion of host cells, secretion of hydrolytic enzymes [3] and the transition from yeast to hyphal filaments, which facilitates its spread [4,5].

There is an increase in the number of fungal infections, mainly due to the increaseraise in resistance to drugs [6,7] and to the limited number of available antifungals, some of which are toxic [8]. In addition, it is very common that antifungal treatments destabilize, more or less severely, the host commensal microbiota, leading to dysbiosis [9] which is favourable to the establishment of another pathogen or recurrence. In addition, because of the presence of similarities between yeasts and human cells (i.e., eukaryotic cells), the development of novel molecules combining antifungal activity and host safety is particularly complicated [8]. These different elements demonstrate the need to develop new therapeutic strategies. These aimed at effectively treating a fungal infection while limiting the health risks for the host; in particular, by preserving the integrity of its microbiota. The use of probiotics to cure candidiasis or fungal-infection-related dysbiosis is part of these novel strategies [10–12]. The World Health Organization (WHO) and the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) define probiotics as "live microorganisms, which, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host" [13]. Under this appellation of probiotics, a wide variety of microbial species, are found within both prokaryotes and eukaryotes (yeasts, such as *Saccharomyces*), although these are mainly lactic bacteria, such as the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* [14]. Currently, a new name is increasingly used to replace the term probiotic: live biotherapeutic products (LBP). These LBP are biological products containing live biotherapeutic microorganisms (LBM) used to prevent, treat or cure a disease or condition of human beings, excluding vaccines [15].

In this issue, we focused on *L. rhamnosus* Lcr35®, which is a well-known probiotic strain whose *in vitro* and *in vivo* characteristics are widely documented [16–23]. It is a gram-positive bacterium commercialized by biose® as a pharmaceutical product for more than 60 years for preventive and curative gastrointestinal and gynaecological indications. Nivoliez *et al.* demonstrated the probiotic properties of the native strain such as resistance to gastric acidity and bile stress and lactic acid production. Under its commercial formulations, the Lcr35® strain has the ability to adhere to intestinal (Caco-2, HT29-MTX) and vaginal (CRL -2616) epithelial cells, but the inhibition of pathogen adhesion to intestinal cells by Lcr35® has not been investigated by the authors. This study has also shown that Lcr35® leads to a strong inhibition of vaginal (*C. albicans*, *Gardnerella vaginalis*) and intestinal (enterotoxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli* (ETEC, EPEC), *Shigella flexneri*) pathogens [24]. These probiotic and antimicrobial effects have been observed during clinical trials, but we know little about the molecular mechanisms underlying these properties. Randomized trials conducted in infants and children have shown that preventive intake of probiotics has a positive impact on the development of infectious or inflammatory bowel diseases by reducing their symptoms and maintaining the balance of the microbiota [25]. *In vitro* and *in vivo* studies using preventive approaches have revealed certain mechanisms of action of probiotics [26].

Up to now, most probiotics used in both food and health applications are selected and characterized on the basis of their properties obtained with *in vitro* models [27] before being tested on complex *in vivo* models (murine models) and in human clinical trials. The *in vitro* studies are used mainly for ethical and cost issues [28] but also allow experimentations under defined and controlled conditions. As a result, some strains meeting the criteria for *in vitro* selection no longer respond *in vivo* and vice versa [29]. This fact reinforces the idea that *in vitro* and *in vivo* tests are complementary and necessary for the most reliable characterization of probiotic properties.

Here, we propose to use both *in vitro* Caco-2 cell culture and the invertebrate host *C. elegans* as an *in vivo* model to investigate microorganism-microorganism-host interactions. Caco-2 cells are a well-characterized enterocyte-like cell line. They are a reliable *in vitro* system to study the adhesion capacity of lactobacilli as well as their probiotic effects, such as protection against intestinal injury induced by pathogens [30,31]. Nevertheless, the use of *in vivo* models, which are closer to the complex environment of the human body, is inevitable in the case of a mechanistic study. Indeed, while rudimentary models such as *C. elegans* or *Drosophila* exhibit obvious benefits for (large) screening purposes, they are also not devoid of relevance in deciphering more universal signalling pathways, even related to mammalian innate immunity [32]. With its many genetic and protein homologies with human beings [33], *C. elegans* has become the ideal laboratory tool for physiological as well as mechanistic studies. This roundworm has already been used to study the pathogenicity mechanisms of *C. albicans*. The work of Pukkila-Worley has demonstrated a rapid antifungal response in *C. elegans* with the overexpression of antimicrobials encoding genes such as *abf-2*, *fipr-22*, *fipr-23*, *cnc-7*, *thn-1* and chitinases (*cht-1* and T19H5.1) or detoxification enzymes (*oac-31*, *trx-3*). It has also been shown that *C. albicans* hyphal formation is a key virulence factor that modifies gene expression in the *C. elegans* killing assay [34]. Some of these genes are notably dependent on the highly conserved p38 MAPK signalling pathway [35]. Several recent studies have established that the transition from yeast morphology to hyphal form is largely dependent on environmental parameters. It is also controlled by *C. albicans* genetic factors, such as eIF2 kinase Gcn2 [36] or SPT20 [37], whose mutations induce a decrease in virulence of the pathogen and an enhanced survival of the host. However, few studies have been conducted with the nematode on the use of probiotic microorganisms for the treatment of *C. albicans* fungal infection [38].

In this context, the aim of this study was to evaluate the effect of the *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35® strain on the prevention of fungal infection due to *C. albicans* using the *in vitro* cellular model Caco-2 and the *in vivo* model *C. elegans*. To overcome the experimental limits of the *in vitro* model, we conducted a mechanistic study solely on the *C. elegans* model. The worm survival and gene expression in response to the pathogen and/or the probiotic were evaluated.

2 Material and methods

2.1 Microbial strains and growth conditions

The *E. coli* OP50 strain was provided by the *Caenorhabditis* Genetics Center (Minneapolis, MN, USA) and was grown on Luria Broth (LB, Miller's Modification) (Conda, Madrid, Spain) at 37 ˚C overnight. The *L. rhamnosus* Lcr35® strain was provided by biose® (Aurillac, France) and was grown in de Man, Rogosa, Sharpe (MRS) broth (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) at 37 ˚C overnight. *C. albicans* ATCC 10231 was grown in yeast peptone glucose (YPG) broth pH 6.5 (per L: 10 g yeast extract, 10 g peptone, 20 g glucose) at 37 ˚C for 48 h. Microbial suspensions were spun down for 2 min at 1,500 rpm (Rotofix 32A, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany) and washed with M9 buffer (per L: 3 g KH_2PO_4, 6 g Na_2HPO_4, 5 g NaCl, 1 mL 1 M $MgSO_4$) to obtain a final concentration of 100 $mg.mL^{-1}$.

2.2 Influence of Lcr35® on *C. albicans* growth and on *C. albicans* biofilm formation on Caco-2 cell monolayers

Growth inhibition of *C. albicans* by the probiotic strain Lcr35® was examined using the human colorectal adenocarcinoma cell line Caco-2 [39]. Caco-2 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM, Life Technologie, Villebon-sur-

Yvette, France) supplemented with 20% inactivated foetal calf serum (Life Technologie) at 37 ˚C with 5% CO_2 in air atmosphere. For the assays, the cells were seeded at a concentration of $3.5x10^5$ cells.well^{-1} in 24-well plates (Dutscher, Brumath, France) and placed in growth conditions for 24 h. Microbial strains were grown according to Nivoliez *et al.* [24]. After growth, cell culture medium was removed and replaced by 1 mL of DMEM and 250 μL of Lcr35® culture (10^8 CFU.mL^{-1}) in each well and incubated for 24 h. Two hundred and fifty microliters of *C. albicans* culture at different concentrations (10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6 and 10^7 CFU.mL^{-1}) were added to each well. After incubation for 24 and 48 h, the inhibition of *C. albicans* by Lcr35® was evaluated. One hundred microliters of suspension were taken from each of the wells, and the number of viable bacteria and/or yeasts was determined by plating serial dilutions of the suspensions onto MRS or Sabouraud agar plates. For the measurement of *C. albicans* biofilm formation, after incubation for 48 h, the wells were washed twice with 0.5 mL of PBS and cells were harvested with 1 mL of trypsin at 37 ˚C. For the inhibition assay, the number of viable bacteria and/or yeasts was determined by plating serial dilutions of the suspensions onto MRS or Sabouraud agar plates. The plates were incubated at 37 ˚C for 72 h (MRS) or 48 h (Sabouraud). Each assay was performed three times independently and contained two technical replicates.

2.3 *C. elegans* maintenance

C. elegans N2 (wild-type) and TJ356 (*daf-16p*::*daf-16a/b*::*GFP* + *rol-6(su1006)*) strains were acquired from the *Caenorhabditis* Genetics Center. The nematodes were grown and maintained at 20 ˚C on nematode growth medium (NGM) (per L: 3 g NaCl; 2.5 g peptone; 17 g agar; 5 mg cholesterol; 1 mM $CaCl_2$; 1 mM $MgSO_4$, 25 mL 1 M potassium phosphate buffer at pH 6) plates supplemented with yeast extract (4 g.L^{-1}) (NGMY) and seeded with *E. coli* OP50 [40]. For all experiments, wild-type *C. elegans* N2 were used except for the study of the localization of DAF-16 (TJ356 strain).

2.4 *C. elegans* synchronization

To avoid variations in results due to age differences, a worm synchronous population was required. Gravid worms were washed off using M9 buffer and spun down for 2 min at 1,500 rpm. Five millilitres of worm bleach (2.5 mL of M9 buffer, 1.5 mL of bleach, 1 mL of 5 M sodium hydroxide) was added to the pellet and vigorously shaken until adult worm body disruption. The action of worm bleach was stopped by adding 20 mL of M9 buffer. The egg suspension was then spun down for 2 min at 1,500 rpm and washed twice with 20 mL of M9 buffer. Eggs were allowed to hatch under slow agitation at 25 ˚C for 24 h in approximately 20 mL of M9 buffer. L1 larvae were then transferred onto NGMY plates seeded with *E. coli* OP50 until they reached the L4/young adult stage.

2.5 *C. elegans* bodyb size measurement

Individual adult worms were imaged using an Evos FL microscope (Invitrogen, Eugene, USA, 10X magnification). After reaching the L4 stage, they were transferred onto NGMY plates previously seeded with the probiotic strain Lcr35®, and their sizes were measured daily for three days. The length of the worm body was determined using ImageJ software as described by Mörck and Pilon (41) and compared to *E. coli* OP50-fed worms. At least 10 nematodes per experiment were imaged in at least three independent experiments.

2.6 *C. elegans* lifespan assay

Synchronous L4 worms were transferred to NGMY with 0.12 mM 5-fluorodeoxyuridine FUdR (Sigma, Saint-Louis, USA) to avoid egg hatching and seeded with 100 μL of microbes at 100 mg.mL^{-1} microbial strain (~50 worms per plate) as previously stated. The plates were kept at 20 ˚C, and live worms were scored each day until the death of all animals. An animal was scored as dead when it did not respond to a gentle mechanical stimulation. This assay was performed as three independent experiments with three plates per condition.

2.7 Effects of *L. rhamnosus* Lcr35® on candidiasis in *C. elegans*

Sequential feeding with Lcr35® and *C. albicans* were induced in *C. elegans* in all experiments (preventive assays). As control groups, monotypic contamination was induced in *C. elegans* by inoculation with only *C. albicans*, Lcr35® or *E. coli* OP50.

2.7.1 Preparation of plates containing probiotic bacteria or pathogenic yeasts. One hundred microliters of Lcr35® or *E. coli* OP50 suspension (100 mg.mL^{-1}) was spread on NGMY + 0.12 mM FUdR plates and incubated at 37 ˚C overnight. Concerning *C. albicans* strains, 100 μL of suspension was spread on Brain Heart Infusion BHI (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) + 0.12 mM FUdR plates and incubated at 37 ˚C overnight.

2.7.2 Survival assay: Preventive treatment. The survival assay was performed according to the work of de Barros [38], with some modifications. During a preventive treatment, young adult worms were placed on plates containing Lcr35® at 20 ˚C for different times (2, 4, 6 and 24 h). Next, the worms were washed with M9 buffer to remove bacteria prior to being placed on *C. albicans* plates for 2 h at 20 ˚C. Infected nematodes were washed off plates using M9 buffer prior to being transferred to a 6-well microtiter plate (approximately 50 worms per well) containing 2 mL of BHI/M9 (20%/80%) + 0.12 mM FUdR liquid assay medium per well and incubated at 20 ˚C. For the control groups (i.e., *E. coli* OP50 + *C. albicans*, *E. coli* OP50 only, Lcr35® only and *C. albicans* only), worms were treated in the same way. Nematodes were observed daily and were considered dead when they did not respond to a gentle mechanical stimulation. This assay was performed as three independent experiments containing three wells per condition.

2.8 Colonization of *C. elegans* intestine by *C. albicans*

To study the colonization of the worm gut by the pathogen *C. albicans*, fluorescent staining of the yeast was performed. The yeast was stained with rhodamine 123 (Yeast Mitochondrial Stain Sampler Kit, Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. A fresh culture of *C. albicans* was performed in YPG broth as described before, 1.6 μL of rhodamine 123 at 25 mM was added to 1 mL of *C. albicans* suspension and incubated at room temperature in the dark for 15 min. The unbound dye was removed by centrifugation (14,000 rpm for 5min at 4 ˚C) (Beckman J2-MC Centrifuge, Beckman Coulter, Brea, USA) and washed with 1 mL of M9 buffer. Subsequently, the nematodes were fed with *E. coli* OP50 or Lcr35® on NGMY plates for 4 h and then with labelled *C. albicans* on BHI plates for 72 h. The nematodes were then visualized using a fluorescence microscope at 100X magnification (Evos FL, Invitrogen).

2.9 RNA isolation and RT- quantitative PCR

Approximately 10,000 worms were harvested from NGMY plates with M9 buffer. Total RNA was extracted by adding 500 μL of TRIzol reagent (Ambion by Life Technologies, Carlsbad, USA). Worms were disrupted using a Precellys (Bertin Instruments, Montigny-le-Bretonneux, France) and glass beads (PowerBead Tubes Glass 0.1 mm, Mo Bio Laboratories, USA). Beads

Table 1. *C. elegans* gene primers for qPCR analysis. GOI: Gene of interest.

Gene name	Gene type	Forward Primer (5'– 3')	Reverse Primer (5'– 3')	Reference
cdc-42	housekeeping	ATCCACAGACCGACGTGTTT	GTCTTTGAGCAATGATGCGA	[42]
Y45F10D.4	housekeeping	CGAGAACCCGCGAAATGTCGGA	CGGTTGCCAGGGAAGATGAGGC	[43]
daf-2	GOI	AAAAGATTTGGCTGGTCAGAGA	TTTCAGTACAAATGAGATTGTCAGC	[44]
daf-16	GOI	TTCAATGCAAGGAGCATTTG	AGCTGGAGAAACACGAGACG	[44]
sek-1	GOI	GCCGATGGAAAGTGGTTTTA	TAAACGGCATCGCCAATAAT	[44]
pmk-1	GOI	CCGACTCCACGAGAAGGATA	AGCGAGTACATTCAGCAGCA	[44]
abf-2	GOI	TCGTCCGTTCCCTTTTCCTT	CCTCTCTTAATAAGAGCACC	This study
fipr-22/fipr-23	GOI	CCCAATCCAGTATGAAGTTG	ATTTCAGTCTTCACACCGGA	This study
cnc-4	GOI	ATGCTTCGCTACATTCTCGT	TTACTTTCCAATGAGCATTC	This study

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216184.t001

were removed by centrifugation at 14,000 rpm for 1 min (Eppendorf® 5415D, Hamburg, Germany), and 100 μL of chloroform was added to the supernatant. Tubes were vortexed for 30 seconds and incubated at room temperature for 3 minmin. The phenolic phase was removed by centrifugation at 12,000 rpm for 15 min at 4 ˚C. The aqueous phase was treated with chloroform as previously described. RNA was precipitated by adding 250 μL of isopropanol for 4 min at room temperature and spun down at 12,000 rpm for 10 min (4 ˚C). The supernatant was discarded, and the pellet was washed with 1,000 μL of 70% ethanol. The supernatant was discarded after centrifugation at 14,000 rpm for 5 min (4 ˚C), and the pellet was dissolved in 20 μL of RNase-free water. RNA was reverse-transcribed using a High-Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) according to the manufacturer's instructions. For real-time qPCR assay, each tube contained 2.5 μL of cDNA, 6.25 μL of Rotor-Gene SYBR Green Mix (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), 1.25 μL of 10 μM primers (reported in Table 1) (Eurogentec, Seraing, Belgium) and 1.25 μL of water. All samples were run in triplicate. Rotor-Gene Q Series Software (Qiagen GmbH) was used for the analysis. In our study, two reference genes, *cdc-42* and Y45F10D.4, were used in all the experimental groups. The quantification of gene-of-interest expression (E_{GOI}) was performed according to the following formula [41] taking into account the efficiency of the PCR for each primer pair and normalizing the expression of the gene of interest by two reference genes (*cdc-42* and Y45F10D.4):

$$E_{GOI} = \frac{(\text{GOI efficiency})^{\Delta Ct_{GOI}}}{\sqrt{(cdc-42\text{efficiency})^{\Delta Ct_{cdc-42}} \times (\text{Y45F10D.4 efficiency})^{\Delta Ct_{Y45F10D.5}}}}$$

The worms fed with *E. coli* OP50 were used as control conditions for the gene expression calculation.

2.10 Statistical analysis

Data are expressed as the mean ± standard deviation.

The *C. elegans* survival assay was examined using the Kaplan-Meier method, and differences were determined using the log-rank test with R software version 3.5.0 [45], and the *survival* [46] and *survminer* [47] packages. For *C. albicans* growth inhibition and biofilm formation and *C. elegans* growth and gene expression of the genes analysed, differences between conditions were determined by a two-way ANOVA followed by a Fisher's Least Significant Difference (LSD) post hoc test using GraphPad Prism version 7.0a for Mac OS X (GraphPad Software, La Jolla, California, USA). A p-value ≤ 0.05 was considered significant.

2.11 DAF-16 nuclear localization

DAF-16 nuclear localization was followed as described elsewhere [48] using a transgenic TJ-356 worm strain constitutively expressing the DAF-16 transcription factor combined with GFP (DAF-16::GFP). Once adults, worms were exposed to a single strain: *E. coli* OP50, Lcr35® or *C. albicans* for 2, 4, 6, 24 and 76 h at 20 °C. A preventive approach was also conducted: worms were placed in the presence of *E. coli* OP50 or Lcr35® for 4 h and then *C. albicans* for 2 hh. The nematodes were subsequently imaged 2, 4, 6 and 24 h after infection. The translocation of DAF-16::GFP was scored by assaying the presence of GFP accumulation in the *C. elegans* cell nuclei using a fluorescence microscope at 40X magnification (Evos FL, Invitrogen).

3 Results

3.1 Anti-*C. albicans* effects of Lcr35® on Caco-2 cell monolayer

3.1.1 Growth inhibition of *CC. albicans*. In the presence of Caco-2 cells, regardless of the concentration of the *C. albicans* inoculum, the yeast grew to similar concentrations that ranged from 7.48 ± 0.39 to 7.83 ± 0.34 log CFU.mL^{-1} after 48 h of incubation. When prophylactic treatment was used, i.e., when the Caco-2 cells were pre-incubated with the probiotic Lcr35®, we observed an inhibition of *C. albicans* growth. Indeed, the bacterium induced a significant inhibition of the yeast growth of 2 log CFU.mL^{-1}, which then reached a concentration ranging from 5.40 ± 0.07 to 6.05 ± 0.25 log CFU.mL^{-1}. Two different inhibition profiles were observed after 48 h. On the one hand, when the inoculum was highly concentrated (7 log CFU.mL^{-1}), we observed a decrease in the yeast population, which is a sign of cell death. On the other hand, when the inoculum was less concentrated (2 to 4 log CFU.mL^{-1}), we noticed that the yeast was able to grow, although its growth seemed to stop between 5.32 ± 0.36 and 5.51 ± 0.14 log CFU.mL^{-1} (Table 2).

3.1.2 Inhibition of *C. albicans* biofilm formation. After 48h of incubation, the *C. albicans* biofilm contained between 5.78 log CFU.mL^{-1} (inoculum at 10^2 CFU.mL^{-1}) and 8.69 log

Table 2. Evolution of the concentration of *C. albicans* in the presence or absence of Lcr35® on Caco-2 cell monolayers.

		Length of incubation (hh)		
Concentration of *C. albicans* inocula (CFU.mL^{-1})	With or without Lcr35®	0	24	48
10^7	with	7.25 ± 0.51	6.39 ± 0.73	6.05 ± 0.25 ****
	without	6.77 ± 0.10	7.29 ± 0.23	7.78 ± 0.41
10^6	with	5.85 ± 0.25	5.47 ± 0.12 *	5.73 ± 0.09 ***
	without	5.76 ± 0.18	7.42 ± 0.27	7.69 ± 0.20
10^5	with	4.77 ± 0.41	5.01 ± 0.12 **	5.49 ± 0.04 ****
	without	4.60 ± 0.28	7.60 ± 0.69	7.83 ± 0.34
10^4	with	3.69 ± 0.21	4.92 ± 0.54	5.51 ± 0.14 *
	without	3.72 ± 0.13	7.09 ± 0.59	7.48 ± 0.39
10^3	with	2.56 ± 0.34	3.59 ± 0.25	5.51 ± 0.16 ****
	without	2.30 ± 0.17	6.60 ± 0.28	7.93 ± 0.45
10^2	with	1.34 ± 0.31	3.18 ± 0.76	5.32 ± 0.36 ***
	without	1.34 ± 0.38	6.18 ± 1.01	7.80 ± 0.27

The results are expressed as $\log_{10}$ CFU.mL^{-1} of yeast alone (controls) or co-incubated with Lcr35® (mean ± standard deviation). A comparison between the conditions with and without Lcr35® was performed using a two-way ANOVA followed by a Fisher's LSD post hoc test
($p < 0.05$: *; $p < 0.01$: **; $p < 0.001$: ***; $p < 0.0001$: ****)

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216184.t002

CFU.mL^{-1} of yeast (inoculum at 10^7 CFU.mL^{-1}). However, since the cells were pre-exposed to Lcr35® and for the same *C. albicans* inocula, we observed a significant decrease in the amount of yeast in the biofilm: 4.32 to 5.16 log CFU.mL^{-1}, which corresponded to an inhibition ranging from 1.46 to 3.53 log. The strongest inhibition was observed in the case where the inoculum of *C. albicans* was the most concentrated (Fig 1).

3.2 Effects of Lcr35® on *C. elegans* physiology

3.2.1 Lcr35® extends the *C. elegans* lifespan. We investigated the effects on *C. elegans* lifespan induced by either the pathogenic yeast *C. albicans* or the probiotic Lcr35®. Feeding adult nematodes with the probiotic strain resulted in a significant increase in the mean lifespan compared to *E. coli* OP50-fed worms ($p = 3.56.10^{-6}$) evolving from 7 to 10 days (+ 42.9%), whereas *C. albicans* had no impact on the mean lifespan of *C. elegans*. On the other hand, when *C. albicans* was used as a feeding source, worms displayed a significantly reduced longevity ($p = 1.27.10^{-5}$), which dropped from 16 to 14 days (-12.5%). Lcr35® did not increase the worm longevity compared to *E. coli* OP50 (Fig 2). These results showed that the probiotic strain ameliorated the mean lifespan without increasing the life expectancy of the worm.

3.2.2 Lcr35® does not modify *C. elegans* growth. The body size of Lcr35® fed nematodes was compared to that of *E. coli* OP50-fed worms. Feeding worms with the probiotic strain did not significantly change the growth rate or body size, as they all reached their maximal length after three days (Fig 3).

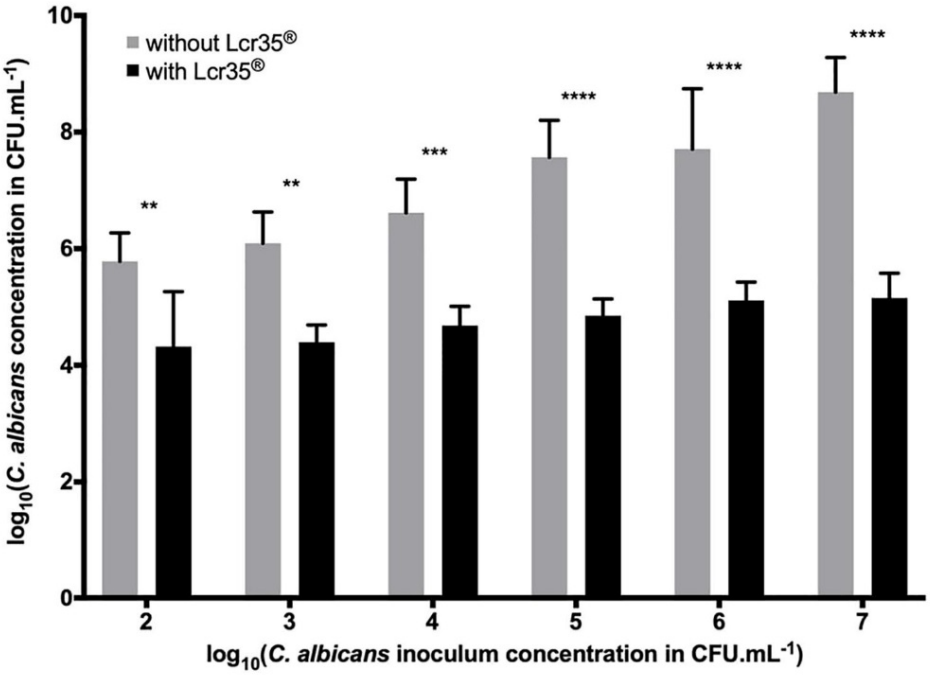


Fig 1. Determination of the *C. albicans* concentration in the biofilm in the presence or absence of Lcr35® (10^8 CFU.mL^{-1}) on the Caco-2 cell monolayer (mean ± standard deviation). Different concentrations of yeast were tested, and the amount present in the biofilm was evaluated after 48 h of incubation. Comparison between conditions with and without Lcr35® was performed using a two-way ANOVA followed by a Fisher's LSD post hoc test ($p < 0.05$: *; $p < 0.01$: **; $p < 0.001$: ***; $p < 0.0001$: ****).

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216184.g001

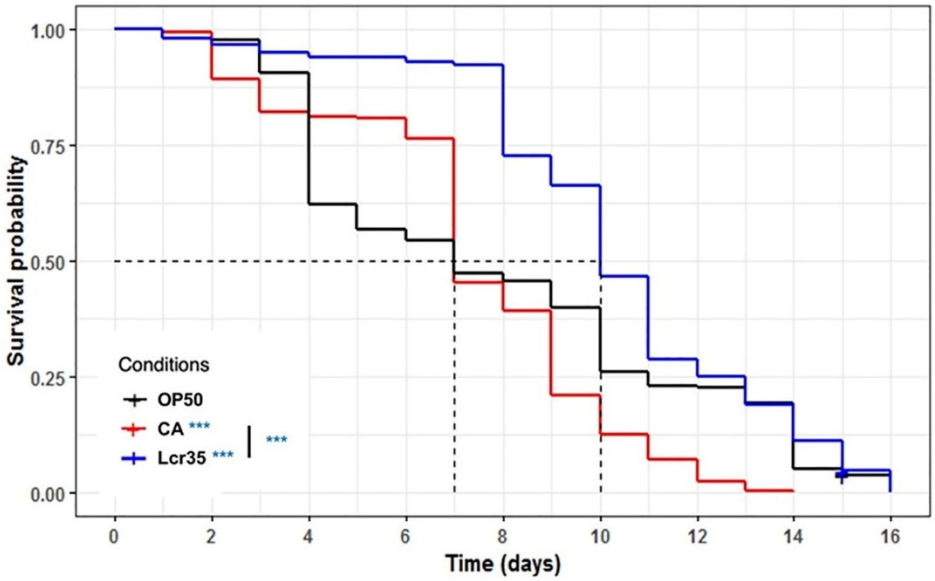


Fig 2. Influence of *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35® and *C. albicans* on the lifespan of the *C. elegans* wild-type N2 strain. Worms were fed *E. coli* OP50 (n = 285), *C. albicans* ATCC 10231 (n = 242), and Lcr35® (n = 278). The mean lifespan, where half of the population was dead, is represented on the abscissa. The asterisks indicate the *p-values* (log-rank test) with *E. coli* OP50 as a control ($p < 0.05$: *; $p < 0.01$: **; $p < 0.001$: ***).

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216184.g002

3.3 Effect of Lcr35® preventive treatment on candidiasis

3.3.1 Effect of Lcr35® on *C. elegans* survival after *C. albicans* exposure. When *C. elegans* was sequentially exposed to Lcr35® for 2 h prior to being infected by *C. albicans*, the

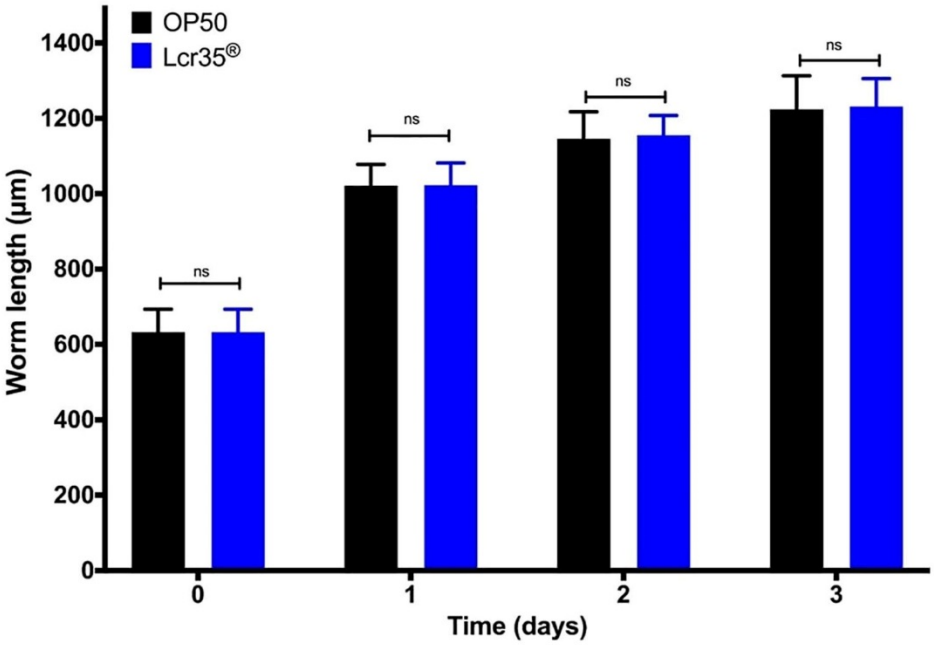


Fig 3. Growth of *C. elegans* (adult) on *E. coli* OP50 and on Lcr35®. All results are represented as means +/- standard deviations (ns: statistically not significant).

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216184.g003

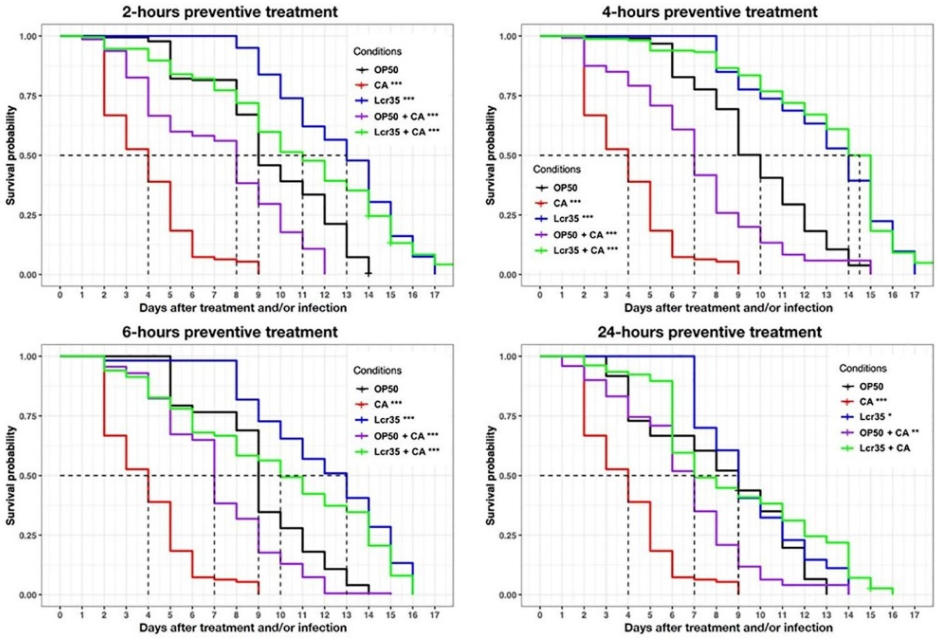


Fig 4. Preventive effects of Lcr35® against *C. albicans* ATCC 10231. Mean survival, where half of the population was dead, is represented on the abscissa. The asterisks indicate the *p-values* (log-rank test) against *E. coli* OP50 ($p < 0.05$: *; $p < 0.01$: **; $p < 0.001$: ***). Infection duration: 2 hour;**2-hour preventive treatment** (*E. coli* OP50 (OP50, n = 126); *C. albicans* ATCC 10231 (CA, n = 424); Lcr35® (Lcr35, n = 93); *E. coli* OP50 + *C. albicans* (OP50 + CA, n = 287); Lcr35® + *C. albicans* (Lcr35 + CA, n = 224));**4-hour preventive treatment** (*E. coli* OP50 (OP50, n = 313); *C. albicans* ATCC 10231 (CA, n = 424); Lcr35® (Lcr35, n = 259); *E. coli* OP50 + *C. albicans* (OP50 + CA, n = 120); Lcr35® + *C. albicans* (Lcr35 + CA, n = 164)); **6-hour preventive treatment** (*E. coli* OP50 (OP50, n = 222); *C. albicans* ATCC 10231 (CA, n = 424); Lcr35® (Lcr35, n = 165); *E. coli* OP50 + *C. albicans* (OP50 + CA, n = 339); Lcr35® + *C. albicans* (Lcr35 + CA, n = 300)); **24-hour preventive treatment** (*E.***treatment** *coli* OP50 (OP50, n = 248); *C. albicans* ATCC 10231 (CA, n = 424); Lcr35® (n = 170); *E. coli* OP50 + *C. albicans* (OP50 + CA, n = 220); Lcr35® + *C. albicans* (Lcr35 + CA, n = 183)).

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216184.g004

survival of the nematodes increased significantly as the mean lifespan increased from 3 to 11 days (267% increase in survival) compared with that observed with *C. albicans* infection alone ($p < 2.10^{-16}$). There was no significant difference in worm survival between those sequentially exposed to Lcr35® and *C. albicans* and those exposed to Lcr35® only (Fig 4) (p = 1). Similar results were obtained with the 4-hours treatment time. In that case, we observed that Lcr35® completely protected *C. elegans* from infection since there was no significant difference with the Lcr35® control condition without infection (p = 0.4).

For longer treatment times (6 and 24 h), we observed a significant decrease in the mean survival in the presence of Lcr35® (condition 6 h: p = 0.04, condition 24 h: $p < 2.10^{-16}$) or Lcr35® and *C. albicans* (condition 6 h: $p = 9.10^{-13}$, condition 24 h: $p < 2.10^{-16}$) compared to the treatment of 4 h. Taken together, the results showed that the 4 probiotic treatment was the most protective against infection.

3.3.2 Influence of Lcr35® on *C. albicans* colonization of the worm gut. To determine whether the anti-*C. albicans* effects observed were due to the removal of the pathogen, colonization of the nematode intestine by *C. albicans* was observed by light microscopy. After three days of incubation in the presence of the pathogen, wild-type worms exhibited notable colonization of the entire digestive tract (Fig 5A). However, this strain of *C. albicans* was not able to form hyphae within the worm. We subsequently applied prophylactic treatment to the worms for 4 h before infecting them with yeast. We observed that after treatment with *E. coli* OP50

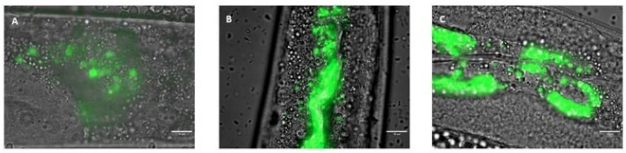


Fig 5. *C. albicans* colonization of the *C. elegans* gut after 72 h (A) and after a 4-hour prophylactic treatment with *E. coli* OP50 (B) or Lcr35® (C). The green colour represents yeast labelled with rhodamine 123. Scale bar, 10 μm.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216184.g005

(Fig 5B) or the probiotic Lcr35® (Fig 5C) followed by infection, the yeast *C. albicans* was still detected in the digestive tract of the host.

3.4 Mechanistic study

3.4.1 Modulation of *C. elegans* gene expression induced by Lcr35® and *C. albicans*. To elucidate the mechanisms involved in the action of Lcr35® against *C. albicans*, we studied the expression of seven *C. elegans* genes (Table 3). We targeted three groups of genes: *daf-2* and *daf-16* (insulin signalling pathway), which are involved in host longevity and anti-pathogenicity; *sek-1* and *pmk-1* (p38 MAPK signalling pathway), which concern the immune response; and *abf-2*, *cnc-4* and *fipr-22/fipr-23*, which encode antimicrobial proteins. We noted that Lcr35® tended to induce an overexpression of *daf-16* ($p = 0.1635$) and had no effect on *daf-2* ($p = 0.2536$), while *C. albicans* tended to induce an upregulation of both genes ($p = 0.1155$ and $p = 0.2396$, respectively). We did not observe any expression modulation of *daf-2* or *daf-16* using a preventive treatment with *E. coli* OP50 ($p = 0.1258$ and $p = 0.1215$, respectively) or with Lcr35® ($p = 0.1354$ and $p = 0.3021$, respectively).

The expression of the *sek-1* and *pmk-1* immunity genes was significantly downregulated in the presence of Lcr35® by 2.63-fold ($p = 0.015$) and 2.78-fold ($p = 0.0149$), respectively, while they were upregulated by *C. albicans* 3.21-fold ($p = 0.0247$) and 4.33-fold (0.1618), respectively. In the control condition, in the presence of *E. coli* OP50 and *C. albicans*, *sek-1* was repressed 2.70 times (0.37-fold with $p = 0.0204$), but *pmk-1* tended to be overexpressed. Preventive treatment with Lcr35® had the same effect on *sek-1* ($p = 0.0016$) but induced no change in *pmk-1* expression ($p = 0.8205$). Finally, among the 3 antimicrobials encoding the genes tested, only the expression of *cnc-4* seemed to be modulated in the presence of Lcr35®, and *cnc-4* was overexpressed ($p = 0.1753$). *C albicans* also seemed to induce the overexpression of *abf-2* ($p = 0.2213$) and *cnc-4* ($p = 0.3228$), but interestingly, *fipr-22/fipr-23* ($p = 0.8225$) expression remained unchanged. Overexpression of *abf-2* (6.25-fold, $p = 0.3158$) and significant

Table 3. Relative expression of the *C. elegans* genes of interest in the presence of Lcr35® and *C. albicans* in pure or sequential cultures in comparison with the control condition *E. coli* OP50 (alone).

	Genes of interest						
	Insulin signalling pathway		p38 MAPK signalling pathway		Antimicrobials		
Conditions	***daf-2***	***daf-16***	***sek-1***	***pmk-1***	***abf-2***	***cnc-4***	***fipr-22 / fipr-23***
Lcr35®	1.35	2.18	0.38 **	0.36 *	1.70	3.39	0.61
C. albicans	2.48	3.31	3.21 *	4.33	11.33	22.32	1.08
E. coli* OP50 + *C. albicans	1.82	0.53	0.37 *	3.40	4.69	0.16 **	0.78
Lcr35® + *C. albicans*	0.69	1.74	0.31 **	1.15	1.61	0.41 *	0.42 *

Genes were considered differentially expressed when the p-value was lower than 0.05 (*) or 0.01 (**) according to Fisher's LSD test and simultaneously when the expression change was at least 2 times or 0.5 times.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216184.t003

repression of *cnc-4* (p = 0.0088) were observed when *E. coli* OP50 was added before infection with *C. albicans*. Using a Lcr35® preventive treatment, *cnc-4* and *fipr-22/fipr-23* were significantly repressed (p = 0.0396 and p = 0.0385, respectively).

3.4.2 Influence of Lcr35® and *C. albicans* on DAF-16 nuclear translocation. To further investigate the mechanisms involved in the anti-*C. albicans* effects of Lcr35®, we followed the nuclear translocation of the DAF-16/FOXO transcription factor using the DAF-16::GFP strain. Whatever the incubation time, the worms did not show any translocation of DAF-16 when fed with *E. coli* OP50 (Fig 6A). When Lcr35® was used as food, we observed a nuclear translocation of the transcription factor, taking place gradually from 4 h of incubation with a maximum intensity in the nuclei after 6 hh. The distribution of DAF-16 was both cytoplasmic and nuclear (Fig 6B). When the nematode was fed exclusively with *C. albicans*, we observed a rapid nuclear translocation of the transcription factor after two hours of incubation in the presence of the pathogen (Fig 6C). This translocation was maintained throughout the experiment, i.e., 76 h.

3.4.3 Effect of Lcr35® preventive treatment on DAF-16 nuclear translocation. We investigated the effect of preventive treatment on the cellular localization of DAF-16 over time after infection by *C. albicans* using the *C. elegans* DAF-16::GFP mutant. When nematodes were first fed with *E. coli* OP50 before being infected, DAF-16 was fully observed in the nuclei

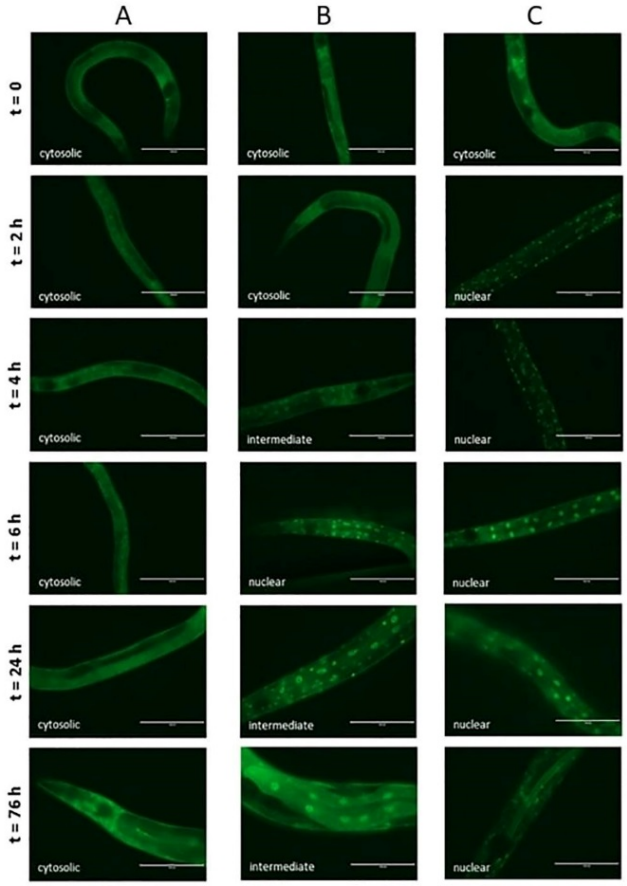


Fig 6. DAF-16 cellular localization in *C. elegans* transgenic strain TJ-356 (*daf-16p::daf-16a/b::GFP + rol-6 (su1006)*) expressing DAF-16::GFP. Worms fed on *E. coli* OP50 (A), on Lcr35® (B) and on *C. albicans* ATCC 10231 (C). Scale bar, 100 μm.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216184.g006

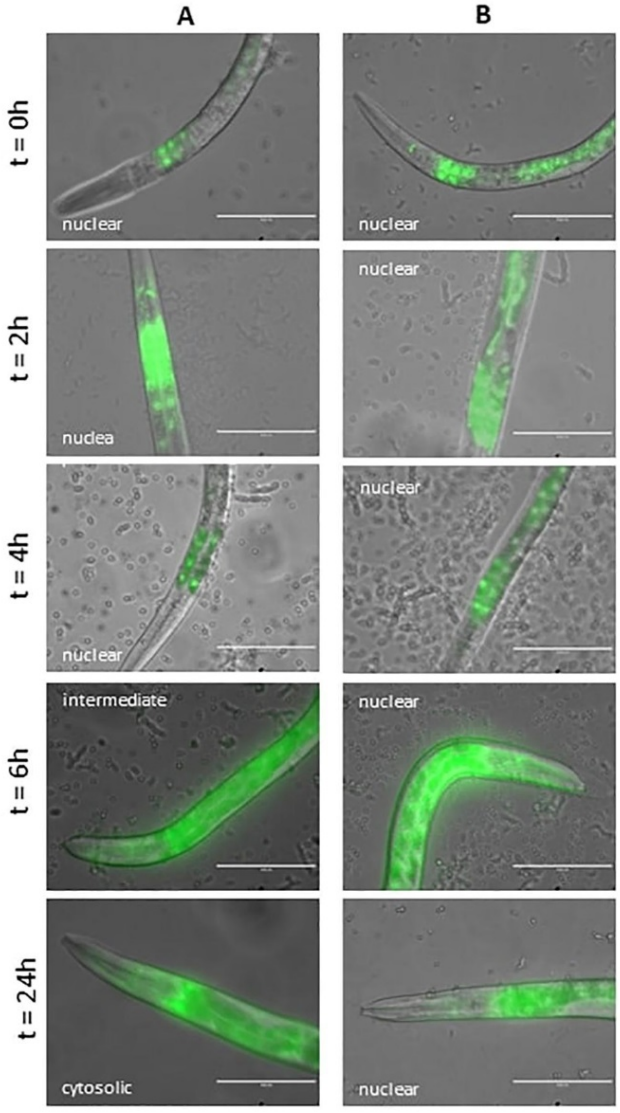


Fig 7. Impact of preventive Lcr35® treatment on DAF-16 cellular localization in the *C. elegans* transgenic strain TJ-356 expressing DAF-16::GFP. Worms fed with *E. coli* OP50 + *C. albicans* (A) and on Lcr35® + *C. albicans* (B). Scale bar, 100 μm.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216184.g007

up to 4 h after infection and then gradually translocated to the cytoplasm after 24 h (Fig 7A). Conversely, the worms that were first exposed to Lcr35® and then to the pathogen showed a different response, and the transcription factor was found only in the nuclei (Fig 7B).

4 Discussion

The selection of microbial strains as probiotics is based on a combination of functional probiotic properties revealed first by classical basic *in vitro* testing. Beyond resistance to gastric pH or bile salts, the ability of a strain to adhere to epithelial cells is frequently studied since this represents a prerequisite for mucosal colonization as part of the anti-pathogen activity. Adhesion is also a key parameter for pathogens since it allows them to release toxins and enzymes directly into the target cell, facilitating their dissemination [49]. Nivoliez *et al.* showed that the

native probiotic strain Lcr35® adhered rather weakly to Caco-2 intestinal cells, while the industrial formulation increased this capacity [24]. We have demonstrated here the ability of Lcr35® to inhibit the growth of the pathogen *C. albicans* and the formation of a *C. albicans* biofilm on an intestinal cell monolayer *in vitro*. As described by Jankowska *et al.*, the low adherence of *L. rhamnosus* compared to *C. albicans* seems to reflect that competition for membrane receptors is not the only mechanism. It is probably related to the synthesis of antifungal effectors by the probiotic as well [49]. Exopolysaccharides (EPS) secreted by certain lactobacilli have been shown to modify the surface properties (hydrophobicity) of microorganisms with direct consequences on their adhesion capacities [50]. EPS have antifungal effects by inhibiting *C. albicans* growth and adhesion to epithelial cells. The surface polysaccharides of *L. rhamnosus* GG, a strain phylogenetically close to Lcr35, appear to interfere in the binding between the fungal lectin-like adhesins and host sugars or between the fungal cell wall carbohydrates and their epithelial adhesion receptor [51]. A recent study has shown that purified fractions of exopolysaccharides also interfered with adhesion capacities of microorganisms [52]. It would be interesting to assay the inhibitory properties of Lcr35® EPS. However, to fully understand the probiotic mechanisms, *in vitro* approaches are too limited. Moving to an *in vivo* approach is mandatory to better understand the interactions between microorganisms (probiotics and pathogens) and the host response.

C. elegans is considered a powerful *in vivo* model for studying the pathogenicity of microorganisms [34,35,53–55] and the antimicrobial properties of lactic acid bacteria [56,57]. The nature of the nutrient source is an important parameter that has a great influence on nematode physiology. Regarding worm growth, it appears that there is some disparity depending on the type of lactic acid bacteria used to feed *C. elegans*. *Bifidobacterium spp*. had no influence on the size of adult worms, although their growth was slightly slowed down [58,59]. *Lactobacillus spp*. by contrast usually result in reduced growth rates and sizes and are sometimes even lethal to the larvae [60,61]. The mechanisms for explaining the longevity extension induced by lactic acid bacteria are not fully understood, but some authors have suggested the involvement of caloric restriction [62–64]. In our case, similar to the work of Komura *et al.*, it seems that Lcr35® did not induce pro-longevity effects through caloric restriction insofar as the growth of Lcr35®-fed nematodes is identical compared to *E. coli* OP50-fed worms [65].

After demonstrating the preventive effect of Lcr35 against *C. albicans* in the nematode, we decided to better understand the protective effect at the mechanistic level. In *C. elegans*, the insulin/IGF-1 signalling pathway is strongly involved in regulating the longevity and immunity of the animal. Signal transduction is mediated through DAF-16, a highly conserved FOXO transcription factor [66]. Using the GFP fusion protein, we have shown that Lcr35® induces translocation of DAF-16 to the nucleus, suggesting that DAF-16 is involved in the probiotic mechanisms of action of Lcr35®. According to several studies, our data suggested that the pro-longevity effect of Lcr35® implements mechanisms involving different regulatory pathways linked to DAF-16, such as the DAF-2/DAF-16 insulin pathway [67] or the c-Jun N-terminal kinase JNK-1/DAF-16 pathway [59]. The absence of modulation of *daf-2* expression in the presence of Lcr35® suggests that the DAF-2/DAF-16 pathway is not involved and that the anti-*Candida* capacity of Lcr35® is due to the JNK signalling pathway. The involvement of these pathways needs to be followed at proteomic and phosphoproteomic levels to validate this hypothesis.

The yeast *C. albicans* is capable of inducing a severe infection in *C. elegans*, causing a rapid death of the host and even after a very short contact time. This infection is first manifested by the colonization of the whole intestinal lumen by yeasts and then by the formation of hyphae piercing the cuticle of the nematode leading to its death [34,68]. In addition, it has been shown that strains of *C. albicans* incapable of forming hyphae, such as SPT20 mutants, have a

significantly reduced pathogenicity in *C. elegans* as well as in *Galleria mellonella* or *Mus musculus* models while still being lethal [37]. In the nematode, it seems that the distention of the intestine caused by the accumulation of yeast is one of the causes of the death of the animal [35]. Recently, de Barros *et al.* [38] showed that *L. paracasei* 28.4 had anti-*C. albicans* activity both *in vitro* and *in vivo* by inhibiting filamentation of yeast protecting the nematode. Although *C. albicans* ATCC 10231 is able to form hyphae during *in vitro* assays, it failed to kill *C. elegans* by filamentation. Therefore, it is likely that Lcr35® represses virulence factors in yeast other than filamentation.

From a mechanistic point of view, several hypotheses can explain the anti-*C. albicans* properties of Lcr35® in the nematode: a direct interaction between the two microorganisms as well as an immunomodulation of the host by the probiotic. According to Nivoliez *et al.* demonstrating the inhibitory capacity of Lcr35® with respect to the pathogen during a co-culture experiment [24], our data showed *Candida albicans* inhibition on mammalian cell monolayers. This inhibition may be due to nutrient competition (i.e., glycogen consumption) or to the production of toxic metabolites against the yeast [24]. We have shown that even after preventive treatment with the probiotic, the digestive tract of the nematode is colonized by the pathogen without showing a pathological state. This suggests that Lcr35® induced repression of virulence factors in *C. albicans*, as shown by De Barros *et al.* [38]. Moreover, an *in vitro* study on human dendritic cells revealed that Lcr35® induced a large dose-dependent modulation not only in the expression of genes mainly involved in the immune response but also in the expression of CD, HLA and TLR membrane proteins. Highly conserved and found in *C. elegans*, TLR also plays a role in the antipathogenic response of the nematode by activating the p38 MAPK pathway [59]. A pro-inflammatory effect has also been shown through cytokine secretion, such as IL-1β, IL-12, TNFα. However, this immunomodulation takes place only in the presence of a high concentration of Lcr35® [69]. In *C. elegans*, DAF-16 is closely related to mammalian FOXO3a, a transcription factor involved the inflammatory process [70]. Therefore, nuclear translocation of DAF-16 by Lcr35® can be interpreted as the establishment of an inflammatory response in the host allowing it to survive an infection. In our study, we observed that the duration of the Lcr35® treatment influences the preventive anti-*C. albicans* effect on nematode lifespan, suggesting that the quantity of Lcr35® ingested and/or the treatment period of time may have an impact on the efficiency of the treatment. A thorough transcriptional study will be interesting to characterize the dose-dependent effect probiotics administered. We demonstrated that Lcr35® induces a transcriptional response in the host by activating the transcription factor DAF-16 and repressing the p38 MAPK signalling pathway, including in the presence of *C. albicans*. We also observed the repression of the genes encoding antimicrobials when fungal infection was preceded by probiotic treatment. The work of Pukkila-Worley *et al.* [35] demonstrated that *C. albicans* induced a fast antifungal response in the host inducing the expression of antimicrobial genes such as *abf-2*, *cnc-4*, *cnc-7*, *fipr-22* and *fipr-23*. With the exception of *abf-2*, all these genes are under the control of PMK-1, whose inactivation makes the nematode susceptible to infection. In our study, we showed that an Lcr35® preventive treatment induced a down-regulation in the *cnc-4*, *fipr-22* and *fipr-23* genes, while *pmk-1* remained unchanged compared to the control condition. Based on the data of Pukkila-Worley *et al.*, the absence of overexpression of these genes in the presence of *C. albicans* after pre-exposure with Lcr35® suggests again that the probiotic inhibits yeast virulence, obviating the establishment of a defence mechanism by the host. Similar results have also been observed with *Salmonella* Enteritidis, where the authors hypothesize that the probiotics used induce immunotolerance in the nematode rather than the synthesis of antimicrobials [58]. The use of *C. elegans* mutants or RNAi could be further considered to decipher the signalling and regulation mechanisms.

5 Conclusion

This study demonstrates the preventive anti-*C. albicans* properties of Lcr35® using both *in vitro* and *in vivo* models. The probiotic strain inhibits the growth of the pathogenic yeast and its ability to form biofilms on intestinal cells *in vitro*. Lcr35® allows protection of the host *C. elegans* against infection despite the presence of *C. albicans* in its gut. Lcr35® during *C. albicans* infection seems to induce a decrease in the immune response of the nematode (downregulation of *sek-1*, *pmk-1*, *abf-2*, *cnc-4* and *fipr-22/23*). Extra studies on *C. elegans* whole transcriptome modulation by Lcr35® would be interesting to further reveal other mechanisms involved. The study of the yeast virulence gene modulation induced by Lcr35® could be very informative about the complex mechanisms of the probiotic mechanisms of action. Additionally, in a second phase, the realization of a comparative study between Lcr35® and other *Lactobacillus* strains (*L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. paracasei*) as well as between different strains of *CC. albicans*, including clinical strains, could be of interest to determine the degree of strain dependence of our results.

Acknowledgments

Some strains were provided by the CGC, which is funded by the NIH Office of Research Infrastructure Programs (P40 OD010440).

We thank Jonathan Heuzé, Muriel Théret and Jeanne Riom, trainees at the UMRF 0545 (UCA/INRA/VAS) for their involvement in the implementation of several experiments. We thank greatly all those who participated in the writing of this article.

Author Contributions

Conceptualization: Cyril Poupet.

Formal analysis: Cyril Poupet.

Investigation: Taous Saraoui, Philippe Veisseire, Muriel Bonnet, Marylise Gachinat, Olivier Camarès.

Methodology: Cyril Poupet.

Supervision: Adrien Nivoliez, Stéphanie Bornes.

Validation: Stéphanie Bornes.

Writing – original draft: Cyril Poupet.

Writing – review & editing: Philippe Veisseire, Muriel Bonnet, Caroline Dausset, Christophe Chassard, Stéphanie Bornes.

References

1. Cauchie M, Desmet S, Lagrou K. *Candida* and its dual lifestyle as a commensal and a pathogen. Res Microbiol [Internet]. 2017 Nov [cited 2018 Sep 5]; 168(9–10):802–10. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923250817300402 PMID: 28263903
2. Neville BA, D'enfert C, Bougnoux M-E. *Candida albicans* commensalism in the gastrointestinal tract. FEMS Yeast Res [Internet]. 2015 [cited 2018 Sep 5]; 15:81. Available from: https://unite.ut.ee/
3. Mayer FL, Wilson D, Hube B. Candida albicans pathogenicity mechanisms. Vol. 4, Virulence. 2013. p. 119–28.
4. Kadosh D, Antonio S. Control of *Candida albicans* morphology and pathogenicity by post-transcriptional mechanisms. Cell Mol Life Sci. 2017; 73(22):4265–78.
5. Wächtler B, Wilson D, Haedicke K, Dalle F, Hube B. From attachment to damage: Defined genes of *Candida albicans* mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells.

Munro C, editor. PLoS One [Internet]. 2011 Feb 23 [cited 2018 Sep 10]; 6(2):e17046. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21407800 PMID: 21407800

6. Farmakiotis D, Kontoyiannis DP. Epidemiology of antifungal resistance in human pathogenic yeasts: current viewpoint and practical recommendations for management. Int J Antimicrob Agents [Internet]. 2017 Sep [cited 2018 Sep 5]; 50(3):318–24. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857917302364 PMID: 28669831
7. Sanguinetti M, Posteraro B, Lass-Flörl C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: Mechanisms and clinical impact. Mycoses [Internet]. 2015 Jun [cited 2018 Sep 5]; 58(S2):2–13. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26033251
8. Scorzoni L, de Paula E Silva ACA, Marcos CM, Assato PA, de Melo WCMA, de Oliveira HC, et al. Antifungal Therapy: New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis. Front Microbiol [Internet]. 2017 [cited 2018 Sep 5]; 8:36. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28167935 PMID: 28167935
9. Wheeler ML, Limon JJ, Bar AS, Leal CA, Gargus M, Tang J, et al. Immunological Consequences of Intestinal Fungal Dysbiosis. Cell Host Microbe [Internet]. 2016; 19(6):865–73. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2016.05.003 PMID: 27237365
10. Hu H-J, Zhang G-Q, Zhang Q, Shakya S, Li Z-Y. Probiotics Prevent *Candida* Colonization and Invasive Fungal Sepsis in Preterm Neonates: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. Pediatr Neonatol [Internet]. 2017 Apr [cited 2018 Sep 5]; 58(2):103–10. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1875957216301401 PMID: 27793494
11. Matsubara VH, Bandara HMHN, Mayer MPA, Samaranayake LP. Probiotics as Antifungals in Mucosal Candidiasis. 2016 [cited 2018 Sep 5]; https://academic.oup.com/cid/article-abstract/62/9/1143/1745140
12. Agrawal S, Rao S, Patole S. Probiotic supplementation for preventing invasive fungal infections in preterm neonates—a systematic review and meta-analysis. Mycoses [Internet]. 2015 Nov 1 [cited 2018 Sep 5]; 58(11):642–51. Available from: http://doi.wiley.com/10.1111/myc.12368 PMID: 26468692
13. FAO, WHO. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Food Nutr Pap [Internet]. 2001 [cited 2016 Jun 14]; http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/9781420009613.ch16
14. Fijan S. Microorganisms with Claimed Probiotic Properties: An Overview of Recent Literature. Int J Environ Res Public Heal Int J Environ Res Public Heal Int J Environ Res Public Heal [Internet]. 2014 [cited 2017 May 13]; 11:4745–67. Available from: www.mdpi.com/journal/ijerph
15. Olle B. Medicines from microbiota. Nat Biotechnol [Internet]. 2013 Apr 5 [cited 2017 Mar 31]; 31(4):309–15. Available from: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nbt.2548 PMID: 23563425
16. Coudeyras S, Jugie G, Vermerie M, Forestier C. Adhesion of human probiotic *Lactobacillus rhamnosus* to cervical and vaginal cells and interaction with vaginosis-associated pathogens. Infect Dis Obstet Gynecol [Internet]. 2008 Jan 27 [cited 2018 Sep 10]; 2008:549640. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19190778 PMID: 19190778
17. Coudeyras S, Marchandin H, Fajon C, Forestier C. Taxonomic and strain-specific identification of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* 35 within the *Lactobacillus casei* group. Appl Environ Microbiol [Internet]. 2008 May [cited 2018 Sep 10]; 74(9):2679–89. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18326671 PMID: 18326671
18. Forestier C, De Champs C, Vatoux C, Joly B. Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: *in vitro* adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. Res Microbiol [Internet]. 2001 Mar [cited 2018 Sep 10]; 152(2):167–73. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11316370 PMID: 11316370
19. de Champs C, Maroncle N, Balestrino D, Rich C, Forestier C. Persistence of colonization of intestinal mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* Lcr35, after oral consumption. J Clin Microbiol [Internet]. 2003 Mar [cited 2018 Sep 10]; 41(3):1270–3. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12624065 PMID: 12624065
20. Petricevic L, Witt A. The role of *Lactobacillus casei rhamnosus* Lcr35 in restoring the normal vaginal flora after antibiotic treatment of bacterial vaginosis. BJOG An Int J Obstet Gynaecol [Internet]. 2008 Oct [cited 2016 Jun 14]; 115(11):1369–74. Available from: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1471-0528.2008.01882.x
21. Muller C, Mazel V, Dausset C, Busignies V, Bornes S, Nivoliez A, et al. Study of the *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35® properties after compression and proposition of a model to predict tablet stability. Eur J Pharm Biopharm. 2014; 88(3):787–94. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.07.014 PMID: 25128853
22. Nivoliez A, Veisseire P, Alaterre E, Dausset C, Baptiste F, Camarès O, et al. Influence of manufacturing processes on cell surface properties of probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35®. Appl Microbiol

Biotechnol [Internet]. 2015 [cited 2017 Jan 1]; 99(1):399–411. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s00253-014-6110-z PMID: 25280746

23. Dausset C, Patrier S, Gajer P, Thoral C, Lenglet Y, Cardot JM, et al. Comparative phase I randomized open-label pilot clinical trial of Gynophilus® (Lcr regenerans®) immediate release capsules versus slow release muco-adhesive tablets. Eur J Clin Microbiol Infect Dis [Internet]. 2018 [cited 2019 Apr 2]; 37 (10):1869–80. Available from: https://doi.org/10.1007/s10096-018-3321-8 PMID: 30032443

24. Nivoliez A, Camares O, Paquet-Gachinat M, Bornes S, Forestier C, Veisseire P. Influence of manufacturing processes on *in vitro* properties of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35®. J Biotechnol. 2012; 160(3–4):236–41. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.04.005 PMID: 22542933

25. Isolauri E, Kirjavainen P V, Salminen S. Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation? Gut [Internet]. 2002; 50(Supplement 3):iii54–9. Available from: http://gut.bmj.com/cgi/doi/10.1136/gut.50.suppl_3.iii54

26. do Carmo MS, Santos C itapary dos, Araújo MC, Girón JA, Fernandes ES, Monteiro-Neto V. Probiotics, mechanisms of action, and clinical perspectives for diarrhea management in children. Food Funct [Internet]. 2018; 9(10):5074–95. Available from: http://dx.doi.org/10.1039/c8fo00376a PMID: 30183037

27. Coudeyras S, Forestier C. Microbiote et probiotiques: impact en santé humaine. Can J Microbiol [Internet]. 2010 [cited 2018 Jan 30]; 56(8):611–50. Available from: http://www.nrcresearchpress.com/doi/pdfplus/10.1139/W10-052 PMID: 20725126

28. Lacroix C, de Wouters T, Chassard C. Integrated multi-scale strategies to investigate nutritional compounds and their effect on the gut microbiota. Curr Opin Biotechnol [Internet]. 2015 [cited 2017 Apr 30]; 32:149–55. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2014.12.009 PMID: 25562815

29. Vinderola G, Gueimonde M, Gomez-Gallego C, Delfederico L, Salminen S. Correlation between *in vitro* and *in vivo* assays in selection of probiotics from traditional species of bacteria. Trends Food Sci Technol [Internet]. 2017; 68:83–90. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.005

30. Montoro BP, Benomar N, Lerma LL, Gutiérrez SC, Gálvez A, Abriouel H. Fermented aloreña table olives as a source of potential probiotic *Lactobacillus pentosus* strains. Front Microbiol. 2016; 7(OCT).

31. Roselli M, Finamore A, Britti MS, Mengheri E. Probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis* MB5 and *Lactobacillus rhamnosus* GG protect intestinal Caco-2 cells from the inflammation-associated response induced by enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. Br J Nutr [Internet]. 2006; 95(06):1177. Available from: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0007114506001589

32. Papadimitriou K, Zoumpopoulou G, Foligné B, Alexandraki V, Kazou M, Pot B, et al. Discovering probiotic microorganisms: *In vitro*, *in vivo*, genetic and omics approaches. Front Microbiol. 2015; 6(FEB):1–28.

33. Lai CH, Chou CY, Ch'ang LY, Liu CS, Lin W. Identification of novel human genes evolutionarily conserved in *Caenorhabditis elegans* by comparative proteomics. Genome Res [Internet]. 2000 May [cited 2018 Sep 10]; 10(5):703–13. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10810093 PMID: 10810093

34. Pukkila-Worley R, Peleg AY, Tampakakis E, Mylonakis E. *Candida albicans* hyphal formation and virulence assessed using a *Caenorhabditis elegans* infection model. Eukaryot Cell [Internet]. 2009 [cited 2018 Feb 7]; 8(11):1750–8. Available from: http://ec.asm.org/content/8/11/1750.full.pdf PMID: 19666778

35. Pukkila-Worley R, Ausubel FM, Mylonakis E. *Candida albicans* infection of *Caenorhabditis elegans* induces antifungal immune defenses. PLoS Pathog. 2011; 7(6).

36. Alves V de S, Mylonakis E. The eIF2 kinase Gcn2 modulates Candida albicans virulence to Caenorhabditis elegans. Clin Microbiol Infect Dis [Internet]. 2018; 3(2):1–4. Available from: https://www.oatext.com/the-eif2-kinase-gcn2-modulates-candida-albicans-virulence-to-caenorhabditis-elegans.php

37. Tan X, Fuchs BB, Wang Y, Chen W, Yuen GJ, Chen RB, et al. The role of *Candida albicans* SPT20 in filamentation, biofilm formation and pathogenesis. PLoS One. 2014; 9(4):1–10.

38. de Barros PP, Scorzoni L, Ribeiro F de C, Fugisaki LR de O, Fuchs BB, Mylonakis E, et al. *Lactobacillus paracasei* 28.4 reduces *in vitro* hyphae formation of *Candida albicans* and prevents the filamentation in an experimental model of *Caenorhabditis elegans*. Microb Pathog [Internet]. 2018; 117(November 2017):80–7. Available from: https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.019

39. Pinto M, Robineleon S, Appay MD, Kedinger M, Triadou N, Dussaulx E, et al. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. Biol Cell [Internet]. 1983 Jan 1 [cited 2018 Oct 10]; 47:323–30. Available from: https://www.scienceopen.com/document?vid=07f3fdcd-c23c-47d4-ad63-105346ef5453

40. Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. Genetics. 1974; 77(1):71–94. PMID: 4366476

41. Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data.

2007 [cited 2017 Jun 14]; 8(2). Available from: http://download.springer.com/static/pdf/804/art%253A10.1186%252Fgb-2007-8-2-r19.pdf?originUrl=http%3A%2F%2Fgenomebiology.biomedcentral.com%2Farticle%2F10.1186%2Fgb-2007-8-2-r19&token2=exp=1497424427~acl=%2Fstatic%2Fpdf%2F804%2Fart%25253A10.1186%25252Fgb-2

42. Semple JI, Garcia-Verdugo R, Lehner B. Rapid selection of transgenic *C. elegans* using antibiotic resistance. Nat Methods [Internet]. 2010 Sep 22 [cited 2017 Apr 13]; 7(9):725–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20729840 PMID: 20729840

43. Hoogewijs D, Houthoofd K, Matthijssens F, Vandesompele J, Vanfleteren JR. Selection and validation of a set of reliable reference genes for quantitative *sod* gene expression analysis in *C. elegans*. BMC Mol Biol [Internet]. 2008 Jan 22 [cited 2017 Apr 13]; 9:9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18211699 PMID: 18211699

44. Nakagawa H, Shiozaki T, Kobatake E, Hosoya T, Moriya T, Sakai F, et al. Effects and mechanisms of prolongevity induced by *Lactobacillus gasseri* SBT2055 in *Caenorhabditis elegans*. Aging Cell. 2016; 15(2):227–36. https://doi.org/10.1111/acel.12431 PMID: 26710940

45. R Core Team. R: A language and Environment for Statistical Computing [Internet]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2018. https://www.r-project.org/

46. Therneau TM. _A Package for Survival Analysis in S_. 2015.

47. Kassambara A, Kosinski M. survminer: Drawing Survival Curves using "ggplot2." 2017.

48. Fatima S, Haque R, Jadiya P, Shamsuzzama, Kumar L, Nazir A. Ida-1, the *Caenorhabditis elegans* orthologue of mammalian diabetes autoantigen IA-2, potentially acts as a common modulator between Parkinson's disease and diabetes: Role of Daf-2/Daf-16 insulin like signalling pathway. PLoS One. 2014; 9(12).

49. Jankowska A, Laubitz D, Antushevich H, Zabielski R, Grzesiuk E. Competition of *Lactobacillus paracasei* with *Salmonella enterica* for adhesion to Caco-2 cells. J Biomed Biotechnol. 2008; 2008(1).

50. Nowak A, Motyl I, Śliżewska K, Libudzisz Z, Klewicka E. Adherence of probiotic bacteria to human colon epithelial cells and inhibitory effect against enteric pathogens–*In vitro* study. Int J Dairy Technol. 2016; 69(4):532–9.

51. Allonsius CN, van den Broek MFL, De Boeck I, Kiekens S, Oerlemans EFM, Kiekens F, et al. Interplay between *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Candida* and the involvement of exopolysaccharides. Microb Biotechnol. 2017; 10(6):1753–63. https://doi.org/10.1111/1751-7915.12799 PMID: 28772020

52. Ruas-Madiedo P, Gueimonde M, Margolles A, de los Reyes-Gavilan CG, Salminen S. Exopolysaccharides Produced by Probiotic Strains Modify the Adhesion of Probiotics and Enteropathogens to Human Intestinal Mucus. J Food Prot [Internet]. 2006; 69(8):2011–5. Available from: http://jfoodprotection.org/doi/abs/10.4315/0362-028X-69.8.2011 PMID: 16924934

53. Irazoqui JE, Troemel ER, Feinbaum RL, Luhachack LG, Cezairliyan BO, Ausubel FM. Distinct pathogenesis and host responses during infection of *C. elegans* by *P. aeruginosa* and *S. aureus*. PLoS Pathog. 2010; 6(7):1–24.

54. Wu K, Conly J, McClure JA, Elsayed S, Louie T, Zhang K. *Caenorhabditis elegans* as a host model for community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect. 2010; 16(3):245–54. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02765.x PMID: 19456837

55. Souza ACR, Fuchs BB, Alves V de S, Jayamani E, Colombo AL, Mylonakis E. Pathogenesis of the *Candida parapsilosis* complex in the model host *Caenorhabditis elegans*. Genes (Basel). 2018; 9(8).

56. Park MR, Ryu S, Maburutse BE, Oh NS, Kim SH, Oh S, et al. Probiotic Lactobacillus fermentum strain JDFM216 stimulates the longevity and immune response of Caenorhabditis elegans through a nuclear hormone receptor. Sci Rep [Internet]. 2018 [cited 2019 Jan 3]; 8(1):7441. Available from: www.nature.com/scientificreports/ PMID: 29748542

57. Kim Y, Mylonakis E. *Caenorhabditis elegans* immune conditioning with the probiotic bacterium *Lactobacillus acidophilus* strain ncfm enhances gram-positive immune responses. Infect Immun. 2012; 80(7):2500–8. https://doi.org/10.1128/IAI.06350-11 PMID: 22585961

58. Ikeda T, Yasui C, Hoshino K, Arikawa K, Nishikawa Y. Influence of lactic acid bacteria on longevity of *Caenorhabditis elegans* and host defense against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. Appl Environ Microbiol. 2007; 73(20):6404–9. https://doi.org/10.1128/AEM.00704-07 PMID: 17704266

59. Zhao L, Zhao Y, Liu R, Zheng X, Zhang M, Guo H, et al. The transcription factor DAF-16 is essential for increased longevity in *C. elegans* Exposed to *Bifidobacterium longum* BB68. Sci Rep [Internet]. 2017; 7(1):7408. Available from: http://www.nature.com/articles/s41598-017-07974-3 PMID: 28785042

60. Zanni E, Laudenzi C, Schifano E, Palleschi C, Perozzi G, Uccelletti D, et al. Impact of a complex food microbiota on energy metabolism in the model organism *Caenorhabditis elegans*. Biomed Res Int. 2015; 2015.

61. Guantario B, Zinno P, Schifano E, Roselli M, Perozzi G, Palleschi C, et al. *In Vitro* and *in Vivo* selection of potentially probiotic lactobacilli from nocellara del belice table olives. Front Microbiol. 2018; 9 (MAR):595.

62. Phelan JP, Rose MR. Why dietary restriction substantially increases longevity in animal models but won't in humans. Ageing Res Rev. 2005; 4(3):339–50. https://doi.org/10.1016/j.arr.2005.06.001 PMID: 16046282

63. Smith ED, Kaeberlein TL, Lydum BT, Sager J, Welton KL, Kennedy BK, et al. Age- and calorie-independent life span extension from dietary restriction by bacterial deprivation in *Caenorhabditis elegans*. BMC Dev Biol. 2008; 8:1–13.

64. Heestand BN, Shen Y, Liu W, Magner DB, Storm N, Meharg C, et al. Dietary Restriction Induced Longevity Is Mediated by Nuclear Receptor NHR-62 in *Caenorhabditis elegans*. PLoS Genet. 2013; 9(7).

65. Komura T, Ikeda T, Yasui C, Saeki S, Nishikawa Y. Mechanism underlying prolongevity induced by bifidobacteria in *Caenorhabditis elegans*. Biogerontology. 2013; 14(1):73–87. https://doi.org/10.1007/s10522-012-9411-6 PMID: 23291976

66. Tullet JMA. DAF-16 target identification in *C. elegans*: past, present and future. Biogerontology [Internet]. 2015; 16(2):221–34. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s10522-014-9527-y PMID: 25156270

67. Grompone G, Martorell P, Llopis S, González N, Genovés S, Mulet AP, et al. Anti-Inflammatory *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-3690 Strain Protects against Oxidative Stress and Increases Lifespan in *Caenorhabditis elegans*. PLoS One. 2012; 7(12).

68. Breger J, Fuchs BB, Aperis G, Moy TI, Ausubel FM, Mylonakis E. Antifungal chemical compounds identified using a *C. elegans* pathogenicity assay. PLoS Pathog. 2007; 3(2):0168–78.

69. Evrard B, Coudeyras S, Dosgilbert A, Charbonnel N, Alamé J, Tridon A, et al. Dose-dependent immunomodulation of human dendritic cells by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35. PLoS One. 2011; 6(4):1–12.

70. Singh V, Aballay A. Regulation of DAF-16-mediated Innate Immunity in *Caenorhabditis elegans*. J Biol Chem [Internet]. 2009 Dec 18 [cited 2018 Dec 14]; 284(51):35580–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19858203 PMID: 19858203

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette étude a permi de démontrer la faisabilité d'utiliser le modèle *C. elegans* pour mettre en évidence les propriétés probiotiques et thérapeutiques de *L. rhamnosus* Lcr35®. La validation du modèle animal est soutenue par des résultats cohérants avec ceux obtenus par des approches *in vitro* et lors d'essais cliniques. À l'avenir, il sera intéressant de réfléchir à inclure les approches utilisant *C. elegans* dans les tests en routine permettant l'identification de nouveaux microorganismes biothérapeutiques vivants.

Pour faire suite à ce travail, des études supplémentaires sur la modulation du transcriptome entier de *C. elegans* par Lcr35® se sont avérées nécessaires pour révéler d'autres mécanismes impliqués. Le chapitre 4 de cette seconde partie sera dédié à ce travail. Par ailleurs, l'étude de la modulation des gènes de virulence de levure (ex. *TEC1*, *UME6*), induite par Lcr35® pourrait fournir de nombreuses informations sur les mécanismes complexes des propriétés inhibitrices du probiotique. De plus, dans une deuxième phase, la réalisation d'une étude comparative entre Lcr35® et d'autres souches de *Lactobacillus* (*L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. paracasei*) ainsi qu'entre différentes souches de *C. albicans*, y compris les souches cliniques, pourrait nous donner des informations sur l'aspect souche-dépendant de nos résultats.

D'un point de vue sociétal, il convient de rappeler que la plupart des personnes ne consomment pas des médicaments (ou des probiotiques) dans le but de prévenir une maladie infectieuse. Cette consommation intervient plutôt dans un objectif curatif. Les probiotiques doivent alors interagir avec un pathogène implanté dans un microbiote, souvent en état de dysbiose. Cette situation représente un état physiologique totalement différent par rapport à une consommation préventive où le microbiote est sain. De ce fait, l'hypothèse la plus probable est que les mécanismes d'action mis en jeu lors d'un traitement préventif sont différents (au moins en partie) de ceux qui le sont lors d'un traitement curatif. Cette hypothèse sera étudiée dans le prochain chapitre.

Chapitre 3.

Études des propriétés curatives de Lcr35®

La résistance de *C. albicans* aux traitements médicamenteux classiques, ainsi que les phénomènes de récurrence dus à une dysbiose qui peut faire suite aux traitements antifongiques, ont mis en évidence la nécessité de mettre en œuvre de nouvelles méthodologies thérapeutiques. Le potentiel antifongique des produits biothérapeutiques vivants (LBP) a déjà été démontré à l'aide de modèles précliniques (cultures cellulaires, animaux de laboratoire). Comprendre leurs mécanismes d'action est stratégique pour le développement de nouveaux traitements pour l'homme. Dans cette étude, nous avons étudié les propriétés curatives anti-*C. albicans* de *L. rhamnosus* Lcr35® en utilisant les modèles *in vitro* Caco-2 et *in vivo C. elegans*. Après une infection par *C. albicans* suivie par l'administration de Lcr35®, nous avons montré que Lcr35® n'inhibait ni la croissance ($p = 0{,}603$) ni la formation de biofilm ($p = 0{,}869$) de *C. albicans in vitro* ce qui est contradictoire avec une étude réalisée précédemment (Nivoliez *et al.* 2012). Lcr35® exerce un effet bénéfique sur la survie de l'animal sujet à une infection fongique (+ 225 % de survie, $p < 2.10^{-16}$), même si la levure est détectable dans l'intestin. En revanche, le surnageant de culture de Lcr35® ne semble pas avoir d'effet antipathogène. Au niveau mécanistique, le facteur de transcription DAF-16 / FOXO est mobilisé en réponse à Lcr35® et les gènes de la voie de signalisation p38 MAPK et les gènes impliqués dans la réponse antifongique sont sur-exprimés en présence de Lcr35® après une infection par *C. albicans*. Ces résultats suggèrent que la souche probiotique Lcr35® agit sur l'hôte *via* DAF-16 et la voie p38 MAPK.

Ce travail a donné lieu à la publication d'un article dans une revue internationale à comité de lecture.

Curative treatment of candidiasis by the live biotherapeutic microorganism *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35® in the invertebrate model *Caenorhabditis elegans*: first mechanistic insights

Cyril Poupet, Philippe Veisseire, Muriel Bonnet, Olivier Camarès, Marylise Gachinat, Caroline Dausset, Christophe Chassard, Adrien Nivoliez and Stéphanie Bornes

Microorganisms, 2019

https://doi.org/10.3390/microorganisms8010034

microorganisms

MDPI

Article

Curative Treatment of Candidiasis by the Live Biotherapeutic Microorganism *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35® in the Invertebrate Model *Caenorhabditis elegans*: First Mechanistic Insights

Cyril Poupet [1,*], Philippe Veisseire [1], Muriel Bonnet [1], Olivier Camarès [1], Marylise Gachinat [1], Caroline Dausset [2], Christophe Chassard [1], Adrien Nivoliez [2] and Stéphanie Bornes [1]

[1] Université Clermont Auvergne, INRAE, VetAgro Sup, UMRF, 15000 Aurillac, France; philippe.veisseire@uca.fr (P.V.); muriel.bonnet@uca.fr (M.B.); olivier.camares@uca.fr (O.C.); marylise.paquet@uca.fr (M.G.); christophe.chassard@inra.fr (C.C.); stephanie.bornes@uca.fr (S.B.)

[2] Biose Industrie, 24 avenue Georges Pompidou, 15000 Aurillac, France; c.dausset@biose.com (C.D.); a.nivoliez@biose.com (A.N.)

* Correspondence: cyril.poupet@uca.fr; Tel.: +33-(0)4-43-79-11-29

Received: 7 November 2019; Accepted: 20 December 2019; Published: 23 December 2019



Abstract: The resistance of *Candida albicans* to conventional drug treatments, as well as the recurrence phenomena due to dysbiosis caused by antifungal treatments, have highlighted the need to implement new therapeutic methodologies. The antifungal potential of live biotherapeutic products (LBP) has already been demonstrated using preclinical models (cell cultures, laboratory animals). Understanding their mechanisms of action is strategic for the development of new therapeutics for humans. In this study, we investigated the curative anti-*C. albicans* properties of *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35® using the in vitro Caco-2 cell and the in vivo *Caenorhabditis elegans* models. We showed that Lcr35® does inhibit neither the growth ($p = 0.603$) nor the biofilm formation ($p = 0.869$) of *C. albicans* in vitro. Lcr35® protects the animal from the fungal infection (+225% of survival, $p < 2 \times 10^{-16}$) even if the yeast is detectable in its intestine. In contrast, the Lcr35® cell-free supernatant does not appear to have any antipathogenic effect. At the mechanistic level, the DAF-16/Forkhead Box O transcription factor is activated by Lcr35® and genes of the p38 MAP Kinase signaling pathway and genes involved in the antifungal response are upregulated in presence of Lcr35® after *C. albicans* infection. These results suggest that the LBM strain acts by stimulating its host via DAF-16 and the p38 MAPK pathway.

Keywords: *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35®; *Candida albicans*; *Caenorhabditis elegans*; curative treatment; immune response

1. Introduction

Despite being a minority in relation to bacterial infections, fungal infections are a growing public health problem. The list of opportunistic fungi causing serious, life-threatening fungal diseases increases almost every year and contains species belonging to *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Geotrichum*, *Trichosporon*, *Rhodotorula*, or *Saccharomyces* genera [1,2].

Yeasts of the genus *Candida* are frequent colonizers of the skin and mucous membranes of animals and dissemination in nature is widespread. Only a few of the more than 150 described species are regularly found as infectious agents in humans including *C. albicans*, in over 50% of cases [2]. The term candidiasis comprises several categories of infections: systemic or invasive *Candida* infections/diseases, such as candidaemia as well as superficial *Candida* infections [3]. Beyond the systemic manifestations, *C. albicans* is also the cause of infection of the gastrointestinal and vaginal tracts (vulvovaginal candidiasis) [4,5]. The candidiasis and fungal infections in general are becoming more difficult to treat, mainly because of the

emergence of antimicrobial multiresistances [6]. This is particularly associated with a decrease in the quality of life (state of health) of patients and a very strong increase in associated medical costs [7].

The concept of anti-infective or antifungal stewardship (AFS) may be defined as an ongoing healthcare effort to optimize antimicrobial use in order to improve patient outcomes, ensure cost-effective therapy and limit antimicrobial resistance [8]. Concepts may not only include the appropriate use of antimicrobials by selecting the proper drug, dosage, duration, route of administration and finally costs related to patient's management. An understanding of the pharmacokinetics and pharmacodynamics (PK/PD) of these drugs has been demonstrated to be important to optimize drug choice and dosing regimen [2].

One of the alternatives to the use of traditional antifungals could be the establishment of a therapy with Live Biotherapeutic Products (LBP). A LBP, as defined by the Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), is "a biological product that: (1) contains live organisms, such as bacteria; (2) is applicable to the prevention, treatment, or cure of a disease or condition of human beings; and (3) is not a vaccine" [9]. Described in the literature for many years, they have the status of Generally Regarded as Safe (GRAS) in the United States of America and Qualified Presumption of Safety (QPS) according to European Food Safety Authority (EFSA) because of the absence of adverse effects when consumed in humans [10]. The interest in using Live Biotherapeutic Microorganisms lies in two characteristics. They initially allow the inhibition and elimination of the pathogen(s) and in a second time, the restoration of a healthy commensal microbiota.

During in vitro investigations, Nivoliez et al. [11] demonstrated the ability of *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35® to kill the pathogenic yeast *Candida albicans* and also *Gardnerella vaginalis*, frequently encountered during bacterial vaginosis and some intestinal pathogens as *Escherichia coli* (EPEC, ETEC) and *Shigella flexnerii*. Moreover, beyond the anti-pathogenic properties, its weak persistence on the mucous membranes linked to its transient residency on mucous membranes is favorable to the resilience of the commensal microbiota. Up to now, we know little about the molecular mechanisms underlying these anti-pathogen properties. Deciphering these mechanisms therefore requires the use of cellular and animal models having enough homology with humans. This type of approach, implemented during our previous work [12], highlighted the preventive protective capacities of the LBM on intestinal Caco-2 cells and the invertebrate *Caenorhabditis elegans*, with respectively an inhibition of the growth of the yeast and an optimal survival of the host. So far, most studies have been conducted in contexts of fungal infection prevention. These have provided answers about the mechanisms of action allowing an LBM to prevent the installation of a pathogen with, for instance, the reduction of *C. albicans* hyphae formation [12–16]. However, few studies showing the efficacy of LBM against candidiasis have been conducted and no "curative" study relative to *C. albicans* was conducted using the nematode *C. elegans* [12,16]. The only curative study was carried out by Sharma and colleagues against infections with *E. coli* pathogenic strains [17]. In addition, it is important to note that patients rarely take preventive treatment instead of a curative one. The study presented here is the first in vitro and in vivo use of an LBM to curatively treat candidiasis.

With this aim in view, we proposed two experimental models to study the host-microorganisms and microorganism-microorganism interactions. In this context, we wanted to evaluate the effect of *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35® strain to cure a fungal infection due to *C. albicans*. In order to overcome the experimental limits of the Caco-2, an enterocyte-like cell line in vitro model, we conducted the mechanistic study on *C. elegans*, an in vivo model relevant for interaction and mechanistic investigations [12]. The worm survival and gene expression, in response to the pathogen and/or the LBM, were evaluated.

2. Results

2.1. Anti C. albicans Effects of L. rhamnosus Lcr35® on Caco-2 Cell Monolayer

2.1.1. Growth Inhibition of *C. albicans*

On a Caco-2 cells monolayer, the yeast grew to 8.31 ± 0.38 log CFU/mL after 48 h of incubation. With a Lcr35® curative treatment, we observed a similar growth of the yeast which reached

7.96 ± 0.18 log CFU/mL (Figure 1). Thus, no significant inhibition (after 24 h, $p = 0.902$; after 48 h, $p = 0.603$) of yeast growth was noted in the presence of the LBM in vitro and in curative condition.

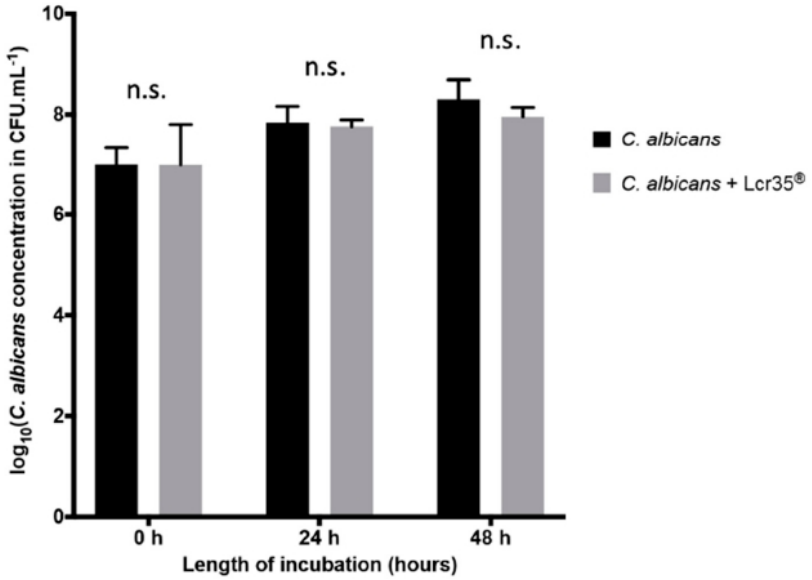


Figure 1. Evolution of the concentration of *C. albicans* in the presence or not of Lcr35® onto Caco-2 cells monolayers. Results are expressed as $\log_{10}$ CFU/mL of yeasts alone (controls) and in co-incubation with Lcr35® (mean ± standard deviation). Comparison between conditions with and without Lcr35® was performed using a two-way ANOVA followed by a Fisher's Least Significant Difference (LSD) post hoc test (n.s.: not significant).

2.1.2. Inhibition of *C. albicans* Biofilm Formation

After 48 h of incubation, the *C. albicans* biofilm contained 8.06 ± 0.42 log CFU/mL of yeasts. A similar concentration has been measured after a Lcr35® curative treatment with 8.10 ± 0.19 log CFU/mL of yeasts (Figure 2). These results suggest that Lcr35® does not inhibit ($p = 0.869$) the formation of a biofilm by *C. albicans* in vitro.

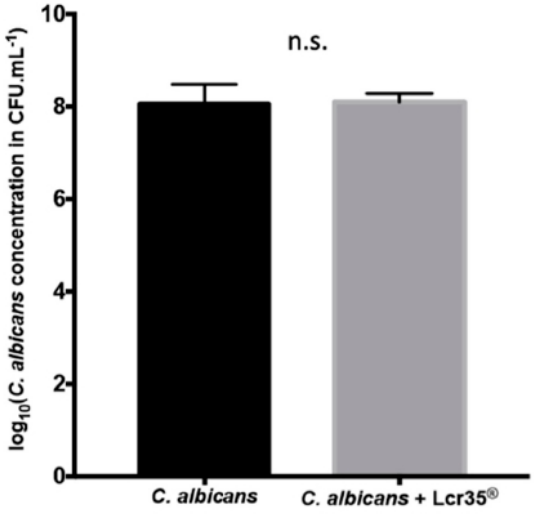


Figure 2. Determination of *C. albicans* concentration present in the biofilm in presence of Lcr35® or not onto Caco-2 cells monolayers (mean ± standard deviation). The amount of yeast present in the biofilm was evaluated after 48 h of incubation. Comparison between conditions with and without Lcr35® was performed using an unpaired t test (n.s.: not significant).

2.2. *Effect of L. rhamnosus Lcr35® Curative Treatment on Candidiasis*

2.2.1. Effect of *L. rhamnosus* Lcr35® on *C. elegans* Survival after *C. albicans* Exposure

When *C. elegans* was sequentially infected by *C. albicans* for 2 h prior being exposed for 2 h to Lcr35®, the survival of the nematodes was significantly increased as the mean lifespan rose from 4 to 13 days (225% increase) compared with that observed with *C. albicans* infection alone ($p < 2 \times 10^{-16}$) (Figure 3). There was no significant difference between worms sequentially exposed to Lcr35® and *C. albicans* and those exposed to Lcr35® only ($p = 0.2$). Similar results were obtained when the nematodes were exposed to the LBM for 4 h. In this case, we observed that Lcr35® protected *C. elegans* from infection even if we observed a slight difference with the Lcr35® control condition without infection ($p = 0.04$). We note that the difference of *C. elegans* lifespan between the 2-h and 4-h curative treatments with Lcr35® was not statistically significant ($p = 0.06$).

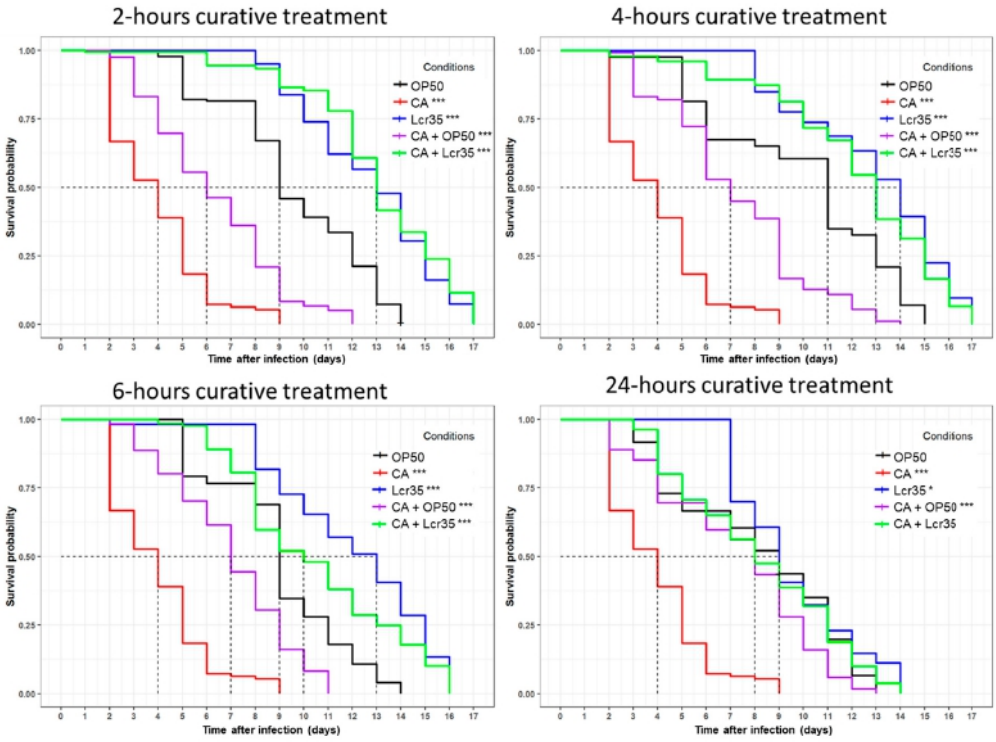


Figure 3. Curative effects of Lcr35® against *C. albicans* ATCC 10231. Mean survival, where half of the population is dead, is represented on the abscissa. The asterisks indicate the *p*-values (log-rank test) against OP50 ($p < 0.05$: *; $p < 0.001$: ***). Infection duration: 2 h; 2-h curative treatment (*E. coli* OP50 (OP50, $n = 179$); *C. albicans* ATCC 10231 (CA, $n = 424$); Lcr35® (Lcr35, $n = 161$); *E. coli* OP50 + *C. albicans* (OP50 + CA, $n = 119$); Lcr35® + *C. albicans* (Lcr35 + CA, $n = 163$)); 4-h curative treatment (*E. coli* OP50 (OP50, $n = 143$); *C. albicans* ATCC 10231 (CA, $n = 424$); Lcr35® (Lcr35, $n = 259$); *E. coli* OP50 + *C. albicans* (OP50 + CA, $n = 274$); Lcr35® + *C. albicans* (Lcr35 + CA, $n = 198$)); 6-h curative treatment (*E. coli* OP50 (OP50, $n = 222$); *C. albicans* ATCC 10231 (CA, $n = 424$); Lcr35® (Lcr35, $n = 165$); *E. coli* OP50 + *C. albicans* (OP50 + CA, $n = 293$); Lcr35® + *C. albicans* (Lcr35 + CA, $n = 129$)); 24-h curative treatment (*E. coli* OP50 (OP50, $n = 148$); *C. albicans* ATCC 10231 (CA, $n = 424$); Lcr35® ($n = 170$); *E. coli* OP50 + *C. albicans* (OP50 + CA, $n = 290$); Lcr35® + *C. albicans* (Lcr35 + CA, $n = 160$)).

For longer Lcr35® treatment times (6 and 24 h), we observed a significant decrease of *C. elegans* mean survival on Lcr35® alone (condition 6 h: $p = 3 \times 10^{-4}$, condition 24 h: $p < 2 \times 10^{-16}$) or in the presence of both Lcr35® and *C. albicans* (condition 6 h: $p = 5 \times 10^{-6}$, condition 24 h: $p < 2 \times 10^{-16}$) compared to the treatment of 4 h. Taken together, the results showed that the 2-h and the 4-h LBM treatments were the most protective against *C. albicans* infection.

2.2.2. Influence of *L. rhamnosus* Lcr35® on *C. albicans* Presence in the Worm Gut

In order to determine whether the anti-*Candida* effects observed were due to the removal of the pathogen, colonization of the intestine of the nematode by *C. albicans* was observed by light microscopy. After three days of incubation in presence of the yeast, the digestive tract of the worm was fully colonized (Figure 4A). We subsequently applied a curative treatment to the worms for 24 h. We observed that after a curative treatment with the control OP50 (Figure 4B) or the LBM Lcr35® (Figure 4C), the yeast *C. albicans* was still detected in the digestive tract of the host.

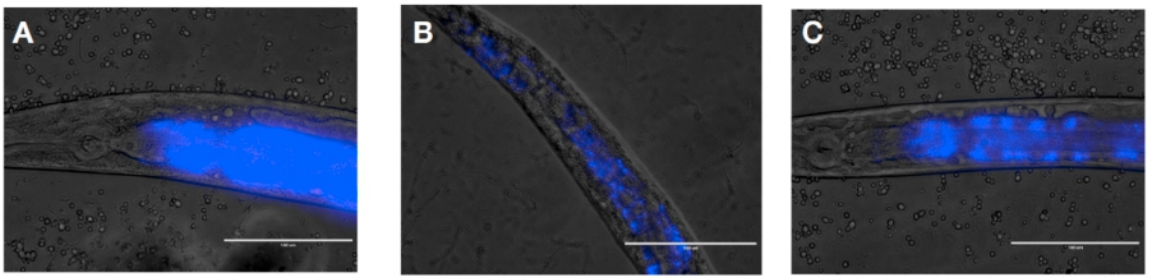


Figure 4. *C. albicans* colonization of *C. elegans* gut after 72 h (**A**) and after a 24-h-curative treatment with *E. coli* OP50 (**B**) or Lcr35® (**C**). The blue color represents yeast labeled with DAPI. Scale bar = 10 µm.

2.3. Effect of L. rhamnosus Lcr35® Cell-Free Supernatant on Candidiasis

The objective of this experiment was to determine whether the anti-*C. albicans* properties of Lcr35® were due to the production of metabolites in the culture supernatant (Table 1). When the worms were previously fed with *E. coli* OP50 and then placed in the presence of 30 or 50% of Lcr35® supernatant, we observed a significant increase ($p < 2 \times 10^{-16}$) of their mean lifespan and longevity compared to the control condition (*E. coli* OP50 strain without supernatant). We note that there was no significant difference ($p = 0.2$) between the control condition Lcr35® and the *E. coli* OP50 condition supplemented with 30% supernatant at pH = 7. Since the worms were in the presence of undiluted supernatant (i.e., 100%), we observed a very strong decrease ($p < 2 \times 10^{-16}$) of median survival and longevity, respectively equal to 1 and 8 days. This result was obtained for both the supernatant at native pH (pH = 4.5) and the neutralized supernatant (pH = 7).

In the case of the worms infected with *Candida albicans* and then treated using cell-free supernatant, only the concentration 30% at pH 4.5 induced a better resistance of the host to the infection ($p < 2 \times 10–16$). Indeed, as soon as the concentration of the supernatant was increased (50 or 100%) or its pH was neutralized, we observed a decrease ($p < 2 \times 10–16$) of the survival of the nematode, which under certain conditions, was lower compared to the control condition *C. albicans*.

Table 1. Effects of Lcr35® cell-free supernatant on *C. elegans* survival, worms previously fed on *E. coli* OP50 or *C. albicans*. Log rank test was performed with *E. coli* OP50 without Lcr35® supernatant as a control.

Microorganism	Lcr35® Supernatant Concentration (%)	Lcr35® Supernatant pH	*C. elegans* Mean Lifespan (days)	*C. elegans* Longevity (days)	Log Rank Test (*p*-Value)
E. coli OP50	no supernatant		9	14	N/A
Lcr35®	no supernatant		13	17	$<2.10^{-16}$
C. albicans	no supernatant		4	9	$<2.10^{-16}$
E. coli OP50	30	4,5	15	20	$<2.10^{-16}$
	30	7	13	18	$<2.10^{-16}$
	50	4,5	12	15	2.10^{-9}
	50	7	14	21	$<2.10^{-16}$
	100	4,5	1	8	$<2.10^{-16}$
	100	7	1	8	$<2.10^{-16}$
C. albicans	30	4,5	5	6	$<2.10^{-16}$
	30	7	2	3	$<2.10^{-16}$
	50	4,5	4	8	$<2.10^{-16}$
	50	7	2	3	$<2.10^{-16}$
	100	4,5	1	5	$<2.10^{-16}$
	100	7	2	3	$<2.10^{-16}$

2.4. Mechanistic Study

In order to explain the mechanisms of action underlying the curative protection of *L. rhamnosus* Lcr35® in the nematode, a mechanistic approach was implemented by studying the modulation of the expression of genes of interest and the cellular localization of the transcription factor DAF-16 in the host. A search for the presence of yeast in the digestive tract was also performed. Due to the fact that the culture supernatant of Lcr35® does not have anti-*Candida* effect in the nematode, the mechanistic study on this aspect was not performed.

2.4.1. Modulation of *C. elegans* Genes Expression Induced by Lcr35® and *C. albicans*

To elucidate the mechanisms involved in the action of Lcr35® against *C. albicans*, we studied the expression of seven *C. elegans* genes (Table 2) divided into three groups: *daf-2* and *daf-16* (insulin signaling pathway) involved in host longevity and antipathogenicity response, *sek-1* and *pmk-1* (p38 MAPK signaling pathway) which concern the immunity reaction as well as *abf-2*, *cnc-4* and *fipr-22*/*fipr-23* which encode antimicrobial proteins. The interest in targeting these genes has been demonstrated by various studies showing that the insulin and p38 MAPK pathways were involved in the pro-longevity properties of lactobacilli and bifidobacteria [12,18–20], while the antimicrobial genes were involved in the anti-*Candida* effect [21]. In comparison with the *E. coli* OP50 control condition, we noted that Lcr35® induced an overexpression of *daf-16* ($p = 0.0004$) and had no effect on *daf-2* ($p = 0.9459$), while *C. albicans* tended to induce an up regulation of *daf-2* ($p = 0.0922$) and a down-regulation of *daf-16* ($p = 0.4959$). In the case of *C. albicans* infection followed by a treatment with *E. coli* OP50, we noted that *daf-2* and *daf-16* genes tended to be downregulated. Conversely, with a Lcr35® curative treatment, *daf-2* tended to be repressed while no change in *daf-16* expression was measured. The expression of the *sek-1* and *pmk-1* immunity genes was down and upregulated in the presence of Lcr35® by 0.5-fold ($p = 0.8679$) and 3.05-fold ($p = 0.3741$), respectively, while they were up regulated by *C. albicans* 4.57-fold ($p = 0.2038$) and 4.66-fold ($p = 0.0933$), respectively. Regarding the genes of the p38 MAPK pathway, we noted no change in gene expression after infection followed by *E. coli* OP50 administration for *sek-1* but a not significant up regulation of *pmk-1*. In contrast, after curative treatment with Lcr35®, *sek-1* was significantly overexpressed ($p = 0.0033$) and *pmk-1* tended to be upregulated. Finally, among the 3 antimicrobials encoding the genes tested, only the overexpression of *cnc-4* was observed in the presence of Lcr35® ($p = 0.3367$). *C. albicans* also induced the overexpression of *abf-2* ($p = 0.3097$),

cnc-4 ($p = 0.0722$), and *fipr-22/fipr-23* ($p = 0.0736$). *cnc-4* tended to be overexpressed and *fipr-22/fipr-23* tended to be repressed when the worms were treated with *E. coli* OP50. On the other hand, *abf-2* and *fipr-22/fipr-23* were significantly overexpressed ($p = 0.0043$ and $p = 0.0209$) after a treatment with Lcr35®.

Table 2. Relative expression of *C. elegans* genes of interest in presence of Lcr35® and *C. albicans* in pure or in sequential cultures in comparison with the control condition *E. coli* OP50 (alone). Genes were considered differentially expressed when the *p*-value was lower than 0.05 (*), 0.01 (**), or 0.001 (***) according to Fisher's LSD test, and simultaneously when the expression change was of at least 2 times or 0.5 times.

	Genes of Interest						
	Insulin Signaling Pathway		p38 MAPK Signaling Pathway		Antimicrobials		
Conditions	***daf-2***	***daf-16***	***sek-1***	***pmk-1***	***abf-2***	***cnc-4***	***fipr-22/fipr-23***
E. coli OP50	1	1	1	1	1	1	1
Lcr35®	0.97	5.84 ***	0.50	3.05	0.90	8.48	0.89
C. albicans	1.87	0.31	4.57	4.66	3.58	14.31	3.45
C. albicans + *E. coli* OP50	0.52	0.41	1.01	2.57	0.95	7.04	0.26
C. albicans + Lcr35®	0.61	1.47	11.24 **	2.42	8.00 **	1.31	4.29 *

2.4.2. Effect of Lcr35® Curative Treatment on DAF-16 Nuclear Translocation

We investigated the effect of curative treatment on the cellular localization of DAF-16 over time after infection by *C. albicans*. With our control condition (*C. albicans* only), the transcription factor DAF-16 was quickly translocated into the nuclei after only 2 h of incubation (Figure 5A). When the worms were infected by the yeast prior being fed with OP50, we observed that DAF-16 was mainly located intermediately between the cytoplasm and the nuclei during the first hours of treatment and then cytoplasmic after 24 h (Figure 5B). After a curative treatment with Lcr35®, the transcription factor appeared more translocated to the nuclei during the first part of the treatment before also getting back to a cytoplasmic localization (Figure 5C).

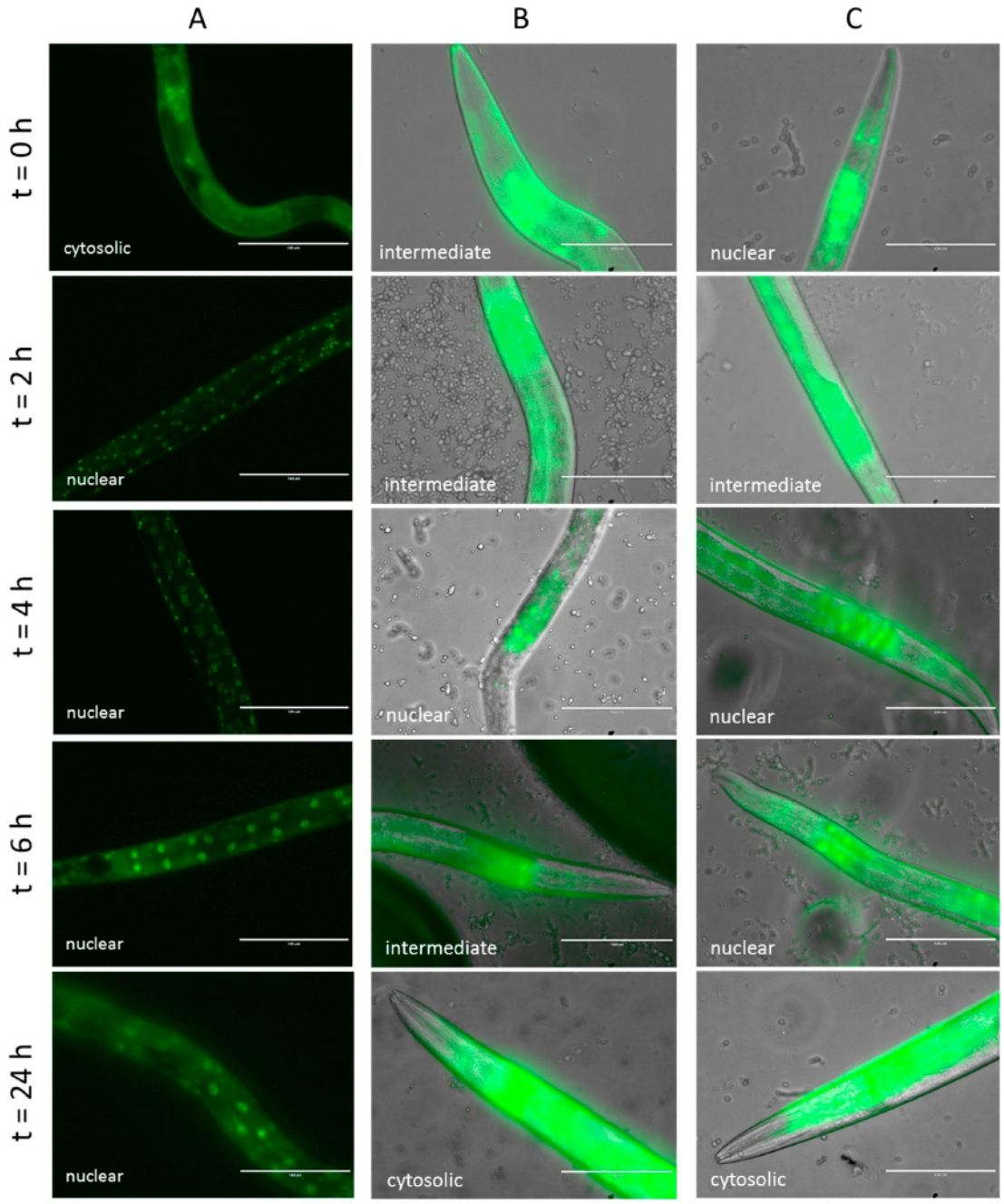


Figure 5. Impact of curative Lcr35® treatment on DAF-16 cellular localization in *C. elegans* transgenic strain TJ-356 expressing DAF-16::GFP. Worms fed on *C. albicans* only (**A**), on *C. albicans* + OP50 (**B**), and on *C. albicans* + Lcr35® (**C**). Scale bar, 100 µm.

3. Discussion

Among the therapeutic arsenal available for the treatment of infectious diseases, including fungal diseases, LBPs appear to be a useful alternative to traditional drugs. In addition to having a very low health risk, they have broad-spectrum antimicrobial properties. Although primarily used by the population for therapeutic purposes, they were often studied as a preventive measure. Beyond the antipathogenic properties of Lcr35®, recent studies in humans have shown improvement in the health of patients with the administration of LBM. The effectiveness of Lcr35® for the treatment of abdominal pain and intestinal functional disorders has been demonstrated in children [22–24] without

however highlighting the molecular mechanisms. Recently, Dausset and colleagues demonstrated in women the safety and well-tolerated characteristics of a new galenic form based on Lcr35®, promoting the growth of endogenous vaginal *Lactobacillus*, in order to prevent an eventual dysbiosis [25]. In a previous study [12], we demonstrated that a preventive administration of Lcr35® strain had two in vitro effects: inhibition of *C. albicans* growth and biofilm formation on a Caco-2 cells monolayer. Anti-*C. albicans* properties targeting in particular the adhesion of the pathogen to the epithelial cells have been attributed to exopolysaccharides (EPS) by various studies [26,27]. We then hypothesized that Lcr35® may synthesize antimicrobial molecules including EPS. However, in these conditions, where Lcr35® is used as a curative treatment, it no longer allows the inhibition of the pathogen on Caco-2 cells monolayers. We have performed here experiments with sequential cultures (*C. albicans* then native Lcr35®) on intestinal cells while Nivoliez et al. was interested in co-cultures (*C. albicans* and industrially formulated Lcr35®) on vaginal cells. The experimental conditions (culture medium, cells) as well as the origin of the LBM strain (native strain vs industrially formulated strain) are two parameters to take into consideration and which are very probably the cause of the difference observed compared with a previous study [11]. The mechanisms involved in a preventive context would therefore not be effective in a curative one, when the pathogen is already present on the cells. Several hypotheses could explain these results. Antimicrobial molecules that inhibit the growth of yeast may only act on dividing cells. Therefore, when the yeast is on stationary phase or does not divide, it is insensitive to these molecules. With regard to adhesion, we can wonder if *C. albicans* adheres to epithelial cell surfaces covalently or using low energy bonds. EPS secreted by Lcr35® will not be able to break covalent bonds because of the absence of hydrolytic activity. If they are low energies, the competition for cell receptors may be in favor of the pathogen. The competition hypothesis between the LBM and the yeast could be further investigated by limiting the initial amount of yeast in order to favor the LBM. However, to fully understand the LBM mechanisms of action, in vitro approaches are too limited. Moving to an in vivo approach is mandatory to study the interactions between microorganisms (LBMs and pathogens) and the host response.

We choose *C. elegans* as a relevant in vivo model for studying the pathogenicity of microorganisms [21,28–31] and the antimicrobial properties of lactic acid bacteria [32,33]. Unlike in vitro experiments which demonstrated no significant antifungal effects of the LBM, those performed in vivo showed that Lcr35® had interesting curative anti-*C. albicans* properties in the nematode. Contradictory results can be explained by the experimental conditions. Thus, in vitro, Lcr35® is probably not in optimal conditions to allow inhibition of the yeast. This reveals the importance of using complementary experimental models (in vitro and in vivo) to overcome their limitations. During our in vivo tests, Lcr35® allowed a statistically significant increase in the survival of the host, including after being contaminated by the yeast. The results obtained are in accordance with those using Lcr35® in a preventive approach [12]. However, the experimental conditions are different. In a preventive approach, Lcr35® has an action on its host before having an antipathogenic activity targeting *C. albicans*. In a curative approach, the LBM first has an action against yeast and eventually on its host. Sharma et al. recently tested the inhibitory properties of *Lactobacillus* spp against infection with pathogenic *E. coli* strains, by co-infection, preventive, and curative approaches. The authors have put forward several hypotheses that can explain the healing properties: the steric exclusion of the pathogen by the probiotic strains as well as the competition for the cellular receptors because of the shared carbohydrate-binding specificities with some entero-pathogens [17]. Our data showed that using supernatants did not allow optimal protection of the host, confirming the essential presence of the LBM Lcr35® cells to observe the anti-*Candida* effect. Thus, it is likely that the mechanism of action is based on a mischaracterized direct interaction between Lcr35® and the yeast. In the absence of pathogenic yeast, with 30–50% supernatant, we observed a significant increase in mean lifespan and worm longevity. On the other hand, during a fungal infection, only 30% of supernatant at pH = 4.5 allows an increase in mean lifespan. We hypothesize that there are two different mechanisms, one or more molecule present in the culture supernatant have a pro-longevity action while others appear to have antifungal effect. In their

work, Dausset et al. demonstrated in vitro that the molecule secreted by Lcr35® and having an anti *C. albicans* activity had a molecular weight smaller than 10 kDa and was resistant to protease, lipase and thermal treatments [34]. However, the molecule in question has not been identified precisely. It is conceivable that this molecule is a bacteriocin but it would be interesting to study its antifungal activity in *C. elegans*. Indeed, a recent study has shown that the bacteriocin EntV secreted by *Enterococcus faecalis* inhibited the growth of yeast and protected the nematode from infection at the same time [34,35]. In addition, another study showed the involvement of extracellular vesicles of *L. plantarum* in the activation of the host immune system against vancomycin-resistant enterococcal infection [36].

In our study, we observed that the duration of the Lcr35® treatment influences the curative anti-*C. albicans* effect on nematode lifespan, suggesting that the quantity of Lcr35® ingested and/or the treatment duration may have an impact on the effectiveness of the treatment. It is conceivable that there is also a dose effect explaining the results obtained with the culture supernatants. The work of Komura et al. showed that there was a dose effect linked to the pro-longevity effects of bifidobacteria, in favor of a low *Bifidobacterium/E. coli* OP50 ratio [37]. A thorough transcriptional study will be interesting to characterize the dose-dependent effect of LBPs administered. Therefore, we can question the relevance of the evaluation of toxicokinetic and pharmacodynamic parameters as is the case for traditional drugs. Such parameters would make it possible to adapt the prescription of LBPs and improve their effectiveness.

We demonstrated that Lcr35® induced a transcriptional response in the host by activating the transcription factor DAF-16 (nuclear translocation), and the activation of the p38 MAPK signalling pathway involved genes, including in the presence of *C. albicans*. From a mechanistic point of view, several hypotheses can explain the anti-*C. albicans* properties of Lcr35® in the nematode: a direct interaction between the two microorganisms as well as an immunomodulation of the host by the LBM. We have shown that even after curative treatment with the LBM, the digestive tract of the nematode is colonized by the pathogen without showing a pathological state. These data are in accordance with De Barros et al. and suggest that Lcr35® induced repression of virulence factors in *C. albicans* [16]. In *C. elegans*, DAF-16 is closely related to mammalian FOXO3a, a transcription factor involved in the inflammatory process [38]. Therefore, nuclear translocation of DAF-16 by Lcr35® can be interpreted as the establishment of an inflammatory response in the host allowing it to survive an infection. The work of Pukkila-Worley et al. [21] demonstrated that *C. albicans* induced a fast antifungal response in the host with the overexpression of antimicrobial genes such as *abf-2*, *cnc-4*, *cnc-7*, *fipr-22*, and *fipr-23*. With the exception of *abf-2*, all these genes are under the control of PMK-1, whose inactivation makes the nematode susceptible to infection. In our study, we showed that Lcr35® curative treatment induced an up regulation of most targeted genes (*sek-1*, *pmk-1*, *fipr-22*, and *fipr-23)*, while *cnc-4* and *daf-16* remained unchanged compared to the control condition. Based on the data of Pukkila-Worley et al. [21], the presence of Lcr35® would allow activation of the host's immune defenses via the highly conserved p38 MAPK signaling pathway. Also, it is possible that the bacterium exerts a direct action on the yeast by at least partially inhibiting its virulence, thus limiting the deleterious effects of *C. albicans* in *C. elegans*. The use of *C. elegans* mutants or RNAi could be further considered deciphering with precision the signalling pathway(s) involved and the regulation mechanisms.

4. Materials and Methods

4.1. Microbial Strains and Growth Conditions

The *E. coli* OP50 strain was provided by the *Caenorhabditis* Genetics Center (Minneapolis, MN, USA) and was grown on Lysogeny Broth (LB, Miller's Modification) (Conda, Madrid, Spain) at 37 °C overnight. The *L. rhamnosus* Lcr35® strain was provided by biose® (Aurillac, France) and was grown in de Man, Rogosa, Sharpe (MRS) broth (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) at 37 °C overnight. *C. albicans* ATCC® 10231™ was grown in yeast peptone glucose (YPG) broth pH 6.5 (per L: 10 g yeast extract (Fisher Scientific, Hampton, NH, USA), 10 g peptone (Conda), 20 g glucose (Sigma, Saint-Louis,

USA)) at 37 °C for 48 h. Microbial suspensions were spun down for 2 min at 1500 rpm (Rotofix 32A, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany) and washed with M9 buffer (per L: 3 g KH_2PO_4, 6 g Na_2HPO_4, 5 g NaCl, 1 mL 1 M $MgSO_4$) (Sigma) to obtain a final concentration of 100 mg/mL.

4.2. Influence of L. rhamnosus Lcr35® on Growth of C. albicans on Caco-2 Cells Monolayer and on Biofilm Formation

Growth inhibition of *C. albicans* by the LBM Lcr35® was examined using the human colorectal adenocarcinoma cell line Caco-2 [39]. Caco-2 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM, Life Technologie, Villebon-sur-Yvette, France) supplemented with 20% inactivated fetal calf serum (Life Technologie) at 37 °C with a 5% CO_2 in air atmosphere. For the assays, the cells were seeded at a concentration of 3.5×10^5 cells/well in 24-well plates (Dutscher, Brumath, France) and placed in growth conditions for 24 h. Microbial strains were grown according to Nivoliez et al. [11]. After growth, cell culture medium was removed and replaced by 1 mL of DMEM and 250 µL of *C. albicans* culture (10^7 CFU/mL) in each well and incubated for 24 h. Lcr35® (250 µL of culture (10^8 CFU/mL)) was added in each well and incubated for 48 h. The inhibition of *C. albicans* by Lcr35® was evaluated during (24 h) and after co-incubation (48 h). One hundred microliters of suspension were taken from each of the wells and the number of viable bacteria and/or yeasts was determined by plating serial dilutions of the suspensions onto MRS or Sabouraud agar plates. For the measurement of *C. albicans* biofilm formation, after incubation for 48 h, the wells were washed twice with 0.5 mL of PBS and cells harvested with 1 mL of trypsin at 37 °C. As for the inhibition assay, the number of viable bacteria or/and yeasts were determined by plating serial dilutions of the suspensions onto MRS or Sabouraud agar plates. The plates were incubated at 37 °C for 72 h (MRS) or 48 h (Sabouraud). Each assay, performed three times independently, contained two technical replicates.

4.3. C. elegans Maintenance

C. elegans N2 (wild-type) and TJ356 (*daf-16p::daf-16a/b::GFP + rol-6(su1006)*) strains were acquired from the *Caenorhabditis* Genetics Center. The nematodes were grown and maintained at 20 °C on nematode growth medium (NGM) (per L: 3 g NaCl (Sigma); 2.5 g peptone (Conda); 17 g agar (Biokar Diagnostics, Beauvais, France); 5 mg cholesterol (Sigma); 1 mM $CaCl_2$ (Sigma); 1 mM $MgSO_4$ (Sigma), 25 mL 1 M potassium phosphate (Sigma) buffer at pH 6) plates supplemented with yeast extract (4 g/L) (NGMY) and seeded with *E. coli* OP50 [40]. For all experiments, wild-type *C. elegans* N2 was used except for the study of the localization of DAF-16 (TJ356 strain).

4.4. C. elegans Synchronization

To avoid variations in results due to age differences, a worm synchronous population was required. Gravid worms were washed off using M9 buffer and spun down for 2 min at 1500 rpm. Five millilitres of worm bleach (2.5 mL of M9 buffer, 1.5 mL of bleach, 1 mL of 5 M sodium hydroxide) were added to the pellet and vigorously shaken until adult worm body disruption. The action of worm bleach was stopped by adding 20 mL of M9 buffer. The egg suspension was then spun down for 2 min at 1500 rpm and washed twice with 20 mL of M9 buffer. Eggs were allowed to hatch under slow agitation at 25 °C for 24 h in approximately 20 mL of M9 buffer. L1 larvae were then transferred onto NGMY plates seeded with *E. coli* OP50 until they reached the L4/young adult stage.

4.5. Effects of L. rhamnosus Lcr35® on Candidiasis in C. elegans

Sequential feeding with Lcr35® and *C. albicans* was induced in *C. elegans* in all experiments (curative assays). As control groups, a monotypic contamination was induced in *C. elegans* by inoculating with only *C. albicans*, Lcr35® or *E. coli* OP50.

4.5.1. Preparation of Plates Containing LBM or Pathogen Yeasts

One hundred microliters of Lcr35® or *E. coli* OP50 suspension (100 mg/mL) were spread on NGMY + 0.12 mM FUdR (Sigma) plates (in order to prevent *C. elegans* progeny) and incubated at 37 °C overnight. Concerning *C. albicans* strain, 100 µL of suspension were spread on Brain Heart Infusion BHI (Biokar Diagnostics) + 0.12 mM FUdR plates and incubated at 37 °C overnight.

4.5.2. Survival Assay: Curative Treatment

The survival assay was performed according to Poupet et al. [12], with some modifications. During a curative treatment, young L4 adult worms were placed on plates containing *C. albicans* for 2 h at 20 °C. Next, worms were washed with M9 buffer to remove yeasts prior being placed on Lcr35®, at 20 °C for different times (2, 4, 6, and 24 h). Infected nematodes were washed off plates using M9 buffer prior to be transferred into a 6-well microtiter plate (approximately 50 worms per well) containing 2 mL of BHI/M9 (20%/80%) + 0.12 mM FUdR liquid assay medium per well and incubated at 20 °C. For the control groups (i.e., *C. albicans* + *E. coli* OP50, *E. coli* OP50 alone, Lcr35® alone and *C. albicans* alone), worms were treated in the same way. Nematodes were observed daily and were considered dead when they did not respond to a gentle mechanical stimulation. This assay was performed as three independent experiments containing three wells per condition.

4.6. Study of L. rhamnosus Lcr35® Cell-Free Supernatant on Candidiasis in C. elegans

The potential protective effect of Lcr35® cell-free supernatant was investigated. For this, a culture of Lcr35® was carried out in MRS broth and incubated for 24 h at 37 °C. The broth was centrifuged for 15 min at 14,000 rpm (Rotofix 32A, Hettich Zentrifugen). The supernatant was then sterilized using a 0.22 µm filter. As before, L4/young adult worms were placed on plates containing *C. albicans* for 2 h at 20 °C. Next, worms were washed with M9 buffer to remove yeasts prior being transferred into a 6-well microtiter plate (about 50 worms per well) containing 2 mL of BHI/M9 (20%/80%) liquid assay medium supplemented by Lcr35® cell-free supernatant (30%, 50%, 100% at pH = 4.5 or pH = 7) and 0.12 mM FUdR per well and incubated at 20 °C. Regarding the supernatant at pH = 7, it was neutralized with a 5N sodium hydroxide solution (Panreac, Barcelona, Spain). For the control groups (i.e., *E. coli* OP50 + Lcr35® cell-free supernatant), worms were treated in the same way. Nematodes were observed daily and were considered dead when they did not respond to a gentle mechanical stimulation. This assay was performed as three independent experiments containing three wells per condition.

4.7. Visualization of C. albicans in C. elegans Intestine

In order to study the presence of the pathogen *C. albicans* in the worm gut, a fluorescent staining of the yeast was performed. The yeast was stained with DAPI (Thermo Scientific, Karlsruhe, Germany) according to the manufacturer's instructions. A fresh culture of *C. albicans* was performed in YPG broth as described in Section 4.1, 10 µL of DAPI at 300 nM was added to 1 mL of *C. albicans* suspension and incubated at room temperature in the dark for 15 min. The unbound dye was removed by centrifugation (14,000 rpm for 5 min at 4 °C) (Beckman J2-MC Centrifuge, Beckman Coulter, Brea, USA) and washed with 1 mL of M9 buffer. Subsequently, the nematodes were fed on labelled-*C. albicans* on BHI plates for 72 h and then with *E. coli* OP50 or Lcr35® on NGMY plates for 24 h. The nematodes were then visualized using a fluorescence microscope at 100× magnification (Evos FL, Invitrogen).

4.8. RNA Isolation and Real-Time Quantitative PCR

Approximately 10,000 worms were harvested from NGMY plates with M9 buffer. Total RNA was extracted by adding 500 µL of TRIzol reagent (Ambion by Life Technologies, Carlsbad, USA). Worms were disrupted using a Precellys (Bertin Instruments, Montigny-le-Bretonneux, France) and glass beads (PowerBead Tubes Glass 0.1 mm, Mo Bio Laboratories, USA). Beads were removed by centrifugation at 14,000 rpm for 1 min (Eppendorf® 5415D, Hamburg, Germany), and 100 µL of chloroform were

added to the supernatant. Tubes were vortexed for 30 s and incubated at room temperature for 3 min. The phenolic phase was removed by centrifugation at 12,000 rpm for 15 min at 4 °C. The aqueous phase was treated with chloroform as previously described. RNA was precipitated by adding 250 µL of isopropanol for 4 min at room temperature and spun down at 12,000 rpm for 10 min (4 °C). The supernatant was discarded, and the pellet was washed with 1 mL of 70% ethanol. The supernatant was discarded after centrifugation at 14,000 rpm for 5 min (4 °C), and the pellet was dissolved in 20 µL of RNase-free water. RNA was reverse-transcribed using a High-Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) according to the manufacturer's instructions. For real-time qPCR assay, each tube contained 2.5 µL of cDNA, 6.25 µL of Rotor-Gene SYBR Green Mix (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), 1.25 µL of 10 µM primers (reported in Table 3) (Eurogentec, Seraing, Belgium), and 1.25 µL of water. All samples were run in triplicate. Rotor-Gene Q Series Software (Qiagen GmbH) was used for the analysis. The quantification of gene-of-interest expression (E_{GOI}) was performed according to the following formula [41] taking into account the efficiency of the PCR for each primer pair and normalizing the expression of the gene of interest by two reference genes: *cdc-42* and Y45F10D.4.

$$E_{GOI} = \frac{(\text{GOI efficiency})^{\Delta Ct_{GOI}}}{\sqrt{(cdc-42\ \text{efficiency})^{\Delta Ct_{cdc-42}} \times (\text{Y45F10D.4 efficiency})^{\Delta Ct_{\text{Y45F10D.5}}}}} \quad (1)$$

The worms fed with *E. coli* OP50 were used as control conditions for the gene expression calculation.

Table 3. Targeted *C. elegans* genes primers for qPCR analysis.

Gene Name	Gene Type	Forward Primer (5′–3′)	Reverse Primer (5′–3′)	Reference
cdc-42	housekeeping	ATCCACAGACCGACGTGTTT	GTCTTTGAGCAATGATGCGA	[42]
Y45F10D.4	housekeeping	CGAGAACCCGCGAAATGTCGGA	CGGTTGCCAGGGAAGATGAGGC	[43]
daf-2	GOI	AAAAGATTTGGCTGGTCAGAGA	TTTCAGTACAAATGAGATTGTCAGC	[44]
daf-16	GOI	TTCAATGCAAGGAGCATTTG	AGCTGGAGAAACACGAGACG	[44]
sek-1	GOI	GCCGATGGAAAGTGGTTTTA	TAAACGGCATCGCCAATAAT	[44]
pmk-1	GOI	CCGACTCCACGAGAAGGATA	AGCGAGTACATTCAGCAGCA	[44]
abf-2	GOI	TCGTCCGTTCCCTTTTCCTT	CCTCTCTTAATAAGAGCACC	[12]
fipr-22/fipr-23	GOI	CCCAATCCAGTATGAAGTTG	ATTTCAGTCTTCACACCGGA	[12]
cnc-4	GOI	ATGCTTCGCTACATTCTCGT	TTACTTTCCAATGAGCATTC	[12]
cnc-7	GOI	TTTTGTTGGCTCTGGTGGCA	ATGAGTCCAGGACGGTACAT	[12]

4.9. DAF-16 Nuclear Localization

DAF-16 nuclear localization was followed as described by others [45] using a transgenic TJ-356 worm strain constitutively expressing the DAF-16 transcription factor fused to GFP (DAF-16::GFP). Once adults, worms were exposed to *C. albicans* for 2, 4, 6, and 24 h at 20 °C. A curative approach was conducted: worms were put in the presence of *C. albicans* for 2 h and after with *E. coli* OP50 or Lcr35® for 4 h at 20 °C. The nematodes were subsequently imaged 2, 4, 6, and 24 h after infection. The translocation of DAF-16::GFP was scored by the observation of the presence of GFP accumulation in the *C. elegans* cell nuclei, using a fluorescence microscope at 40× magnification (Evos FL, Invitrogen).

4.10. Statistical Analysis

Data are expressed as the mean ± standard deviation. The *C. elegans* survival assay was examined by using the Kaplan-Meier method, and differences were determined by using the log-rank test with R software version 3.6.1 [46], and the survival [47] and survminer [48] packages. For *C. albicans* growth inhibition and *C. elegans* gene expressions, differences between conditions were determined by a two-way ANOVA followed by a Fisher's Least Significant Difference (LSD) post hoc test using GraphPad Prism version 8.2.0 for macOS (GraphPad Software, La Jolla, California, USA). For *C. albicans* biofilm formation, differences between conditions were determined by an unpaired t test using GraphPad Prism version 8.2.0 for macOS. Each experiment was performed in three different replicates. A difference with p-value ≤ 0.05 was considered as significant.

5. Conclusions

This study showed the effectiveness of the LBM Lcr35® in a curative context. Although it did not allow the reduction of the fungal growth in vitro in our experimental conditions, it had in vivo antifungal capabilities with a protection of the *C. albicans* infected worm *C. elegans*. Our data suggest that a Lcr35® treatment tends to activate *C. elegans* immune response (overexpression genes of the p38 MAPK pathway and encoding for antimicrobials). An exhaustive transcriptomic study would allow a better understanding of the interactions between *C. elegans*, *C. albicans* and Lcr35®. Once the molecular mechanisms well characterized, it would be of interest to evaluate the possibility to extrapolate to other strains of *Lactobacillus* spp. and *Candida* spp. and to include the *C. elegans* approaches in the usual tests allowing the identification of new live biotherapeutic microorganisms.

Author Contributions: C.P., M.G., and O.C. designed the protocols and scientific approaches. C.P., P.V., M.G., and O.C. carried out the experiments with help from M.B., and S.B. C.P. wrote the manuscript. P.V., M.B., C.D., C.C., and S.B. provided critical feedback. A.N. and S.B. supervised the project. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the European funds FEDER and the Auvergne-Rhône-Alpes Region in the form of grants to C.P. as well as biose® as part of the doctoral thesis of C.P. The funder biose® provided support in the form of salaries for authors C.D. and A.N.

Acknowledgments: This work was supported by the European funds FEDER, the Auvergne Rhône Alpes Region and biose® as part of the doctoral thesis of Cyril Poupet. Some strains were provided by the CGC, which is funded by NIH Office of Research Infrastructure Programs (P40 OD010440). We thank Jonathan Heuzé and Muriel Théret, trainees at the UMRF 0545 (UCA/INRAE/VetAgro Sup) for their involvement in the implementation of several experiments. We thank Claudia Thoral and Haymen Girgis for the careful review and advice provided for the writing of this article. We thank greatly all those who took part in the writing of this article.

Conflicts of Interest: The funders (the European union, the Auvergne Rhône Alpes and biose® Industrie), had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Pfaller, M.A.; Diekema, D.J. Epidemiology of Invasive Candidiasis: A Persistent Public Health Problem. *Clin. Microbiol. Rev.* **2007**, *20*, 133–163. [CrossRef]
2. Ruhnke, M. Clinical Syndromes: Candida and Candidosis. In *Clinically Relevant Mycoses*; Presterl, E., Ed.; Springer: Cham, Switzerland, 2019.
3. Pappas, P.G.; Kauffman, C.A.; Andes, D.; Benjamin, D.K., Jr.; Calandra, T.F.; Edwards, J.E., Jr.; Filler, S.G.; Fisher, J.F.; Kullberg, B.J.; Ostrosky-Zeichner, L.; et al. Clinical Practice Guidelines for the Management of Candidiasis: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* **2009**, *48*, 503–535. [CrossRef] [PubMed]
4. Yano, J.; Sobel, J.D.; Nyirjesy, P.; Sobel, R.; Williams, V.L.; Yu, Q.; Noverr, M.C.; Fidel, P.L. Current patient perspectives of vulvovaginal candidiasis: Incidence, symptoms, management and post-treatment outcomes. *BMC Womens Health* **2019**, *19*, 48. [CrossRef]
5. Kumamoto, C. Inflammation and gastrointestinal Candida colonization Carol. *Curr. Opin. Microbiol.* **2011**, *14*, 386–391. [CrossRef] [PubMed]
6. Spettel, K.; Barousch, W.; Makristathis, A.; Zeller, I.; Nehr, M.; Selitsch, B.; Lackner, M.; Rath, P.M.; Steinmann, J.; Willinger, B. Analysis of antifungal resistance genes in *Candida albicans* and *Candida glabrata* using next generation sequencing. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0210397. [CrossRef] [PubMed]
7. Moran, C.; Grussemeyer, C.A.; Spalding, J.R.; Benjamin, D.K.; Reed, S.D.; Reed, D.S.D. Comparison of costs, length of stay, and mortality associated with *Candida glabrata* and *Candida albicans* bloodstream infections. *Am. J. Infect. Control* **2010**, *38*, 78–80. [CrossRef] [PubMed]
8. Mac Dougall, C.; Polk, R.E. Antimicrobial Stewardship Programs in Health Care Systems. *Clin. Microbiol. Rev.* **2005**, *18*, 638–656. [CrossRef]
9. Dreher-Lesnick, S.M.; Stibitz, S.; Carlson, P.E., Jr. US Regulatory Considerations for Development of Live Biotherapeutic Products as Drugs. *Microbiol. Spectr.* **2017**, *5*. [CrossRef]

10. O'Toole, P.W.; Marchesi, J.R.; Hill, C. Next-generation probiotics: The spectrum from probiotics to live biotherapeutics. *Nat. Microbiol.* **2017**, *2*, 17057. [CrossRef]
11. Nivoliez, A.; Camares, O.; Paquet-Gachinat, M.; Bornes, S.; Forestier, C.; Veisseire, P. Influence of manufacturing processes on in vitro properties of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35®. *J. Biotechnol.* **2012**, *160*, 236–241. [CrossRef]
12. Poupet, C.; Saraoui, T.; Veisseire, P.; Bonnet, M.; Dausset, C.; Gachinat, M.; Camarès, O.; Chassard, C.; Nivoliez, A.; Bornes, S. *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35 as an effective treatment for preventing *Candida albicans* infection in the invertebrate model *Caenorhabditis elegans*: First mechanistic insights. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0216184. [CrossRef] [PubMed]
13. Patrignani, F.; Siroli, L.; Parolin, C.; Serrazanetti, D.I.; Vitali, B.; Lanciotti, R. Use of *Lactobacillus crispatus* to produce a probiotic cheese as potential gender food for preventing gynaecological infections. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0208906. [CrossRef] [PubMed]
14. Romeo, M.G.; Romeo, D.M.; Trovato, L.; Oliveri, S.; Palermo, F.; Cota, F.; Betta, P. Role of probiotics in the prevention of the enteric colonization by *Candida* in preterm newborns: Incidence of late-onset sepsis and neurological outcome. *J. Perinatol.* **2011**, *31*, 63–69. [CrossRef] [PubMed]
15. Kumar, S.; Bansal, A.; Chakrabarti, A.; Singhi, S. Evaluation of Efficacy of Probiotics in Prevention of *Candida* Colonization in a PICU—A Randomized Controlled Trial*. *Crit. Care. Med.* **2013**, *41*, 565–572. [CrossRef] [PubMed]
16. De Barros, P.P.; Scorzoni, L.; Ribeiro, F.C.; Fugisaki, L.R.O.; Fuchs, B.B.; Mylonakis, E.; Jorge, A.O.C.; Junqueira, J.C.; Rossoni, R.D. *Lactobacillus paracasei* 28.4 reduces in vitro hyphae formation of *Candida albicans* and prevents the filamentation in an experimental model of *Caenorhabditis elegans*. *Microb. Pathog.* **2018**, *117*, 80–87. [CrossRef]
17. Sharma, K.; Pooranachithra, M.; Balamurugan, K.; Goel, G. Probiotic mediated colonization resistance against *E. coli* infection in experimentally challenged *Caenorhabditis elegans*. *Microb. Pathog.* **2019**, *127*, 39–47. [CrossRef]
18. Zhou, M.; Liu, X.; Yu, H.; Yin, X.; Nie, S.-P.; Xie, M.-Y.; Chen, W.; Gong, J. Cell Signaling of *Caenorhabditis elegans* in Response to Enterotoxigenic *Escherichia coli* Infection and *Lactobacillus zeae* Protection. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1745. [CrossRef]
19. Schifano, E.; Zinno, P.; Guantario, B.; Roselli, M.; Marcoccia, S.; Devirgiliis, C.; Uccelletti, D. The Foodborne Strain *Lactobacillus fermentum* MBC2 Triggers *pept-1*-Dependent Pro-Longevity Effects in *Caenorhabditis elegans*. *Microorganisms* **2019**, *7*, 45. [CrossRef]
20. Zhao, L.; Zhao, Y.; Liu, R.; Zheng, X.; Zhang, M.; Guo, H.; Zhang, H.; Ren, F. The transcription factor DAF-16 is essential for increased longevity in *C. elegans* Exposed to *Bifidobacterium longum* BB68. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 7408. [CrossRef]
21. Pukkila-Worley, R.; Ausubel, F.M.; Mylonakis, E. *Candida albicans* infection of *Caenorhabditis elegans* induces antifungal immune defenses. *PLoS Pathog.* **2011**, *7*, e1002074. [CrossRef]
22. Wegh, C.A.M.; Benninga, M.A.; Tabbers, M.M. Effectiveness of Probiotics in Children with Functional Abdominal Pain Disorders and Functional Constipation A Systematic Review. *J. Clin. Gastroenterol.* **2018**, *52*, S10–S26. [CrossRef] [PubMed]
23. Wojtyniak, K.; Szajewska, H. Systematic Review: Probiotics for Functional Constipation in Children. *J. Pediatr.* **2017**, *176*, 1155–1162. [CrossRef] [PubMed]
24. Wojtyniak, K.; Horvath, A.; Dziechciarz, P.; Szajewska, H. Lactobacillus casei rhamnosus Lcr35 in the Management of Functional Constipation in Children: A Randomized Trial. *J. Pediatr.* **2017**, *184*, 101–105.e1. [CrossRef] [PubMed]
25. Dausset, C.; Patrier, S.; Gajer, P.; Thoral, C.; Lenglet, Y.; Cardot, J.M.; Judlin, P.; Ravel, J.; Nivoliez, A. Comparative phase I randomized open-label pilot clinical trial of Gynophilus® (Lcr regenerans®) immediate release capsules versus slow release muco-adhesive tablets. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2018**, *37*, 1869–1880. [CrossRef] [PubMed]
26. Nowak, A.; Motyl, I.; Śliżewska, K.; Libudzisz, Z.; Klewicka, E. Adherence of probiotic bacteria to human colon epithelial cells and inhibitory effect against enteric pathogens—In vitro study. *Int. J. Dairy Technol.* **2016**, *69*, 532–539.

27. Allonsius, C.N.; van den Broek, M.F.L.; De Boeck, I.; Kiekens, S.; Oerlemans, E.F.M.; Kiekens, F.; Foubert, K.; Vandenheuvel, D.; Cos, P.; Delputte, P.; et al. Interplay between *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Candida* and the involvement of exopolysaccharides. *Microb. Biotechnol.* **2017**, *10*, 1753–1763. [CrossRef]
28. Irazoqui, J.E.; Troemel, E.R.; Feinbaum, R.L.; Luhachack, L.G.; Cezairliyan, B.O.; Ausubel, F.M. Distinct pathogenesis and host responses during infection of *C. elegans* by *P. aeruginosa* and *S. aureus*. *PLoS Pathog.* **2010**, *6*, e1000982. [CrossRef]
29. Wu, K.; Conly, J.; McClure, J.A.; Elsayed, S.; Louie, T.; Zhang, K. *Caenorhabditis elegans* as a host model for community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Infect.* **2010**, *16*, 245–254. [CrossRef]
30. Souza, A.C.R.; Fuchs, B.B.; Alves V de, S.; Jayamani, E.; Colombo, A.L.; Mylonakis, E. Pathogenesis of the *Candida parapsilosis* complex in the model host *Caenorhabditis elegans*. *Genes* **2018**, *9*, 401. [CrossRef]
31. Pukkila-Worley, R.; Peleg, A.Y.; Tampakakis, E.; Mylonakis, E. *Candida albicans* hyphal formation and virulence assessed using a *Caenorhabditis elegans* infection model. *Eukaryot. Cell* **2009**, *8*, 1750–1758. [CrossRef]
32. Park, M.R.; Ryu, S.; Maburutse, B.E.; Oh, N.S.; Kim, S.H.; Oh, S.; Jeong, S.Y.; Jeong, D.Y.; Oh, S.; Kim, Y. Probiotic *Lactobacillus fermentum* strain JDFM216 stimulates the longevity and immune response of *Caenorhabditis elegans* through a nuclear hormone receptor. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 7441. [CrossRef] [PubMed]
33. Kim, Y.; Mylonakis, E. *Caenorhabditis elegans* immune conditioning with the probiotic bacterium *Lactobacillus acidophilus* strain ncfm enhances gram-positive immune responses. *Infect. Immun.* **2012**, *80*, 2500–2508. [CrossRef] [PubMed]
34. Dausset, C. Détermination des mécanismes d'inhibition de souches de lactobacilles. In *Influence du procédé industriel sur leurs caractéristiques probiotiques*; AgroParisTech: Jouy-en-Josas, France, 2015.
35. Graham, C.E.; Cruz, M.R.; Garsin, D.A.; Lorenz, M.C. Enterococcus faecalis bacteriocin EntV inhibits hyphal morphogenesis, biofilm formation, and virulence of Candida albicans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 4507–4512. [CrossRef] [PubMed]
36. Li, M.; Lee, K.; Hsu, M.; Nau, G.; Mylonakis, E.; Ramratnam, B. Lactobacillus-derived extracellular vesicles enhance host immune responses against vancomycin-resistant enterococci. *BMC Microbiol.* **2017**, *17*, 66. [CrossRef] [PubMed]
37. Komura, T.; Ikeda, T.; Yasui, C.; Saeki, S.; Nishikawa, Y. Mechanism underlying prolongevity induced by bifidobacteria in *Caenorhabditis elegans*. *Biogerontology* **2013**, *14*, 73–87. [CrossRef]
38. Singh, V.; Aballay, A. Regulation of DAF-16-mediated Innate Immunity in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 35580–35587. [CrossRef]
39. Pinto, M.; Robineleon, S.; Appay, M.D.; Kedinger, M.; Triadou, N.; Dussaulx, E.; Lacroix, B.; Simonassmann, P.; Haffen, K.; Fogh, J.; et al. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol. Cell* **1983**, *47*, 323–330.
40. Brenner, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **1974**, *77*, 71–94.
41. Hellemans, J.; Mortier, G.; De Paepe, A.; Speleman, F.; Vandesompele, J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome. Biol.* **2007**, *8*, R19. [CrossRef]
42. Semple, J.I.; Garcia-Verdugo, R.; Lehner, B. Rapid selection of transgenic *C. elegans* using antibiotic resistance. *Nat. Methods.* **2010**, *7*, 725–727. [CrossRef]
43. Hoogewijs, D.; Houthoofd, K.; Matthijssens, F.; Vandesompele, J.; Vanfleteren, J.R. Selection and validation of a set of reliable reference genes for quantitative *sod* gene expression analysis in *C. elegans*. *BMC Mol. Biol.* **2008**, *9*, 9. [CrossRef] [PubMed]
44. Nakagawa, H.; Shiozaki, T.; Kobatake, E.; Hosoya, T.; Moriya, T.; Sakai, F.; Taru, H.; Miyazaki, T. Effects and mechanisms of prolongevity induced by *Lactobacillus gasseri* SBT2055 in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* **2016**, *15*, 227–236. [CrossRef] [PubMed]
45. Fatima, S.; Haque, R.; Jadiya, P.; Shamsuzzama Kumar, L.; Nazir, A. Ida-1, the *Caenorhabditis elegans* orthologue of mammalian diabetes autoantigen IA-2, potentially acts as a common modulator between Parkinson's disease and diabetes: Role of Daf-2/Daf-16 insulin like signalling pathway. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e113986. [CrossRef] [PubMed]
46. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2018; Available online: https://www.r-project.org/ (accessed on 10 September 2019).

47. Therneau, T.M. A Package for Survival Analysis in R. 2015. Available online: https://github.com/therneau/survival (accessed on 10 September 2019).
48. Kassambara, A.; Kosinski, M. Survminer: Drawing Survival Curves using "ggplot2." 2017. Available online: http://www.sthda.com/english/rpkgs/survminer/ (accessed on 10 September 2019).



© 2019 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 (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Cette étude a montré l'efficacité du LBM Lcr35® dans un contexte curatif. Bien qu'il n'ait pas permis la réduction de la croissance fongique *in vitro* dans nos conditions expérimentales, il a montré des capacités antifongiques *in vivo* avec une protection du ver infecté par *C. albicans*. Nos données suggèrent qu'un traitement avec Lcr35® va activer la réponse immunitaire de *C. elegans via* la surexpression des gènes de la voie p38 MAPK et des gènes codant pour des molécules antimicrobiennes. Une étude transcriptomique globale permettrait de mieux comprendre les interactions entre *C. elegans*, *C. albicans* et Lcr35® dans le contexte de l'approche curative.

Comme dans le cas de l'approche préventive, une fois les mécanismes moléculaires caractérisés, il est envisagé d'évaluer la possibilité d'extrapoler les résultats obtenus à d'autres souches de *Lactobacillus* spp. et *Candida* spp.

Pris dans leur globalité, les résultats obtenus lors d'approches préventives (chapitre 2) et lors d'approches curatives suggèrent que les mécanismes mis en jeu sont différents, au moins partiellement. La comparaison des profils transcriptomiques chez l'hôte *C. elegans* met en évidence ces différences. Il serait dès lors intéressant de prendre en compte ce type de réponse différentielle dans la mise au point de formulations industrielles afin d'en optimiser les propriétés thérapeutiques en fonction du type de prescription (préventive ou curative). Aussi, afin d'apporter une compréhension plus fine des mécanismes mis en jeu lors d'une approche curative et des différences par rapport à une approche préventive, une étude transcriptomique globale a été réalisée (Chapitre 4).

Chapitre 4.

Étude mécanistique de la réponse de *C. elegans*

C. elegans a été utilisé comme modèle *in vivo* pour analyser les effets pro-longévité, et anti-candidose du LBM *L. rhamnosus* Lcr35®. Pour aller plus loin dans la compréhension des mécanismes impliqués, une approche globale a été utilisée. Cette analyse transcriptomique à haut débit (RNAseq) a révélé une réponse spécifique de *C. elegans* selon que le ver est en présence de la bactérie, de la levure ou des deux. En parallèle, des études sur des mutants « perte de fonction » ont démontré que les protéines DAF-2, DAF-16, SEK-1 et SKN-1 étaient impliqués dans l'augmentation de la durée de vie induite par Lcr35® alors qu'elle était indépendante de *jnk-1*. Ces expérimentations ont également montré que l'effet anti *C. albicans* de la bactérie mobilisait DAF-16*6* et SEK-1 alors qu'il était indépendant de DAF-2 et SKN-1. De plus, l'effet pro-longévité observé du Lcr35® n'est pas dû à la protection contre le stress oxydatif (H_2O_2). Ensemble, ces résultats ont montré l'implication de la kinase p38 MAP et des voies de signalisation de type insuline pour les propriétés de pro-longévité et anti-*C. albicans* de Lcr35®. Dans l'ensemble, ces résultats fournissent de nouvelles informations pour comprendre les mécanismes d'action d'une souche probiotique.

Poupet C, Rifa E, Theil S, Bonnet M, Veisseire P, Cardin G, et al. The p38 MAP kinase pathway and the DAF-16 transcription factor are involved in prolongevity and anti-candidiasis properties of *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35® in *Caenorhabditis elegans*. In prep.

Note : cet article correspond à une première ébauche d'un article original dont la soumission est prévue ultérieurement. Il sera donc amené à évoluer.

The p38 MAP kinase pathway and the DAF-16 transcription factor are involved in prolongevity and anti-candidiasis properties of *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35® in *Caenorhabditis elegans*

Authors:

Cyril Poupet[1*], Etienne Rifa[1], Sébastien Theil[1], Muriel Bonnet[1], Philippe Veisseire[1], Guillaume Cardin[1], Elise Guéret[3], Stéphanie Rialle[3], Christophe Chassard[1], Adrien Nivoliez[2] and Stéphanie Bornes[1]

Affiliations:

[1] Université Clermont Auvergne, INRAE, VetAgro Sup, UMRF,15000, Aurillac, France

[2] Biose Industrie, 24 avenue Georges Pompidou, Aurillac, France

[3] MGX, Univ Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier, France

*Corresponding author:

cyril.poupet@uca.fr

Université Clermont Auvergne

IUT de Clermont-Ferrand, campus universitaire Simone Veil

100 rue de l'égalité

15013 Aurillac CEDEX

Running title: Mechanistic study of Lcr35® probiotic properties

Preliminary draft

1 Abstract

Lactic acid bacteria, including *Lactobacillus*, are the major representatives of probiotics or Live Biotherapeutic Microorganism in the case of proven antimicrobial properties. However, in most cases, the mechanisms of action remain unknown. The antifungal potential of live biotherapeutic microorganisms (LBM) has already been demonstrated using preclinical models (cell cultures, laboratory animals). Understanding their mechanisms of action is strategic for the development of new therapeutics for humans. Here, *Caenorhabditis elegans* was used as an *in vivo* model to analyze pro-longevity, anti-aging and anti-candidiasis effects of the LBM *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35®. A high-throughput transcriptomic analysis revealed a specific response of *C. elegans* depending on whether it is in the presence of the bacterium (structural response), the yeast (metabolic response) or both. Studies on DAF-2, DAF-16, JNK-1, SEK-1 and SKN-1 mutants demonstrated that *daf-2*, *daf-16*, *sek-1* and *skn-1* genes were involved in the extended lifespan provided by this bacterial strain whereas it was *jnk-1* independent. In addition, the anti *C. albicans* effect of the bacterium requires the *daf-16* and *sek-1* genes while it is independent of *daf-2* and *skn-1*. In addition, the anti-aging effect of Lcr35®, linked to the extension of longevity, is not due to protection against oxidative stress (H_2O_2). Taken together, these results have formally shown the involvement of the p38 MAP kinase and insulin-like signaling pathways for the prolongevity and anti-*Candida albicans* properties of Lcr35®. Overall, these findings provide new insight for understanding the mechanisms of action of a probiotic strain with antimicrobial potential.

Keywords: *C. elegans*; probiotic; candidiasis; host response; mechanisms of action

2 Introduction

Microorganisms with probiotic potential are often found in the commensal microbiota of the intestine of mammals [**1**]. They are especially known for their role in gut homeostasis [**2**] and in enhancing host immunity [**3**]. Initially defined by the World Health Organization (WHO) and the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) as « live microorganisms,

Preliminary draft

which, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host » [**4**], probiotics whose therapeutic properties have been proven clinically are now known under the name Live Biotherapeutic Microorganisms (LBM) or Live Biotherapeutic Products (LBP). A LBP, as defined by the Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), is "a biological product that: (1) contains live organisms, such as bacteria; (2) is applicable to the prevention, treatment, or cure of a disease or condition of human beings; and (3) is not a vaccine" [**5**].

The first investigations performed [**6**] on lactic acid–producing bacteria (LAB) and their health effects in humans by Metchnikov in 1908 suggested that LAB ingestion improved host health. Most of studies of probiotics LAB have shown their beneficial effects using *in vitro* models but lack insight into the potential mechanism of action.

Caenorhabditis elegans is a small soil nematode that primarily feeds on bacteria. It is widely used as an experimental system for aging, various biological research studies, including bacterial infection, and immunological research, because of their morphological simplicity, suitability for genetic analysis, ease of maintenance in the laboratory, and short lifespan and reproductive cycle [**7**].

Due to its genetic and protein proximity to humans [**8**], the *C. elegans* model allows experiments to be carried out in order to characterize the interactions between different microorganisms and a host. It has already been used to study the pathogenicity mechanisms of *Candida albicans* [**9**], [**10**]. Pukkila-Worley and colleagues discovered and characterized the antifungal response put in place by the worm upon contact with the yeast. This response involves the expression of genes coding for antimicrobials (*fipr-22*, *fipr-23*) but also detoxification enzymes (*trx-3*). They also demonstrated that part of these antimicrobials was dependent on the p38 MAPK signaling pathway, a pathway that is highly conserved in the animal kingdom. [**11**]. However, few studies have been conducted with the nematode on the use of probiotic microorganisms for the treatment of *C. albicans* fungal infection [**12**]–[**14**].

Precedent *in vitro* investigations of Nivoliez *et al.* [**15**] revealed a high killing rate of *C. albicans* induced by *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35®. The authors demonstrated that although Lcr35® adheres little to epithelial cells, it favorably allows the restoration of commensal microbiota.

Preliminary draft

Until now, the molecular mechanisms responsible for the anti-pathogenic activity of Lcr35® have been little described in the literature. The establishment of animal models sufficiently close to humans is therefore necessary in order to characterize them.

In our previous studies, the probiotic properties of *L. rhamnosus* Lcr35® were highlighted in the nematode *C. elegans* model. We have demonstrated that *L. rhamnosus* Lcr35® induces a significant increase in the longevity of the nematode when it was fed with this bacterium. We hypothesized that this increase in longevity was related to activation of the transcription factor FoxO DAF-16. On the other hand, we did not note any impact of the bacterial strain on the growth of the nematode [**13**]. Second, when we simulated a fungal infection with *Candida albicans* in *C. elegans*, using either a preventive approach [**13**] or a curative approach [**14**], Lcr35® provided effective protection of the host against candidiasis. A significant increase in longevity has been shown in these fungal infection conditions, although the presence of yeast in the digestive tract of the worm has been detected. Using preliminary mechanistic analyzes, we hypothesized that preventive therapy appeared to suppress the immune response of the nematode with repression of genes encoding antimicrobials as well as the p38 MAPK pathway. Conversely, during a curative treatment, we observed the stimulation of host immunity. These two works contributed to demonstrating the relevance of the nematode model to study the interactions between different microorganisms but also with a host, here between a bacterium, a yeast and a metazoan.

In this paper, we focused on the study of the mechanisms of action allowing to explain the preventive probiotic properties of *L. rhamnosus* Lcr35® including the pro survival and anti *Candida albicans* activities. For this, the invertebrate model *Caenorhabditis elegans* was used to characterize the signaling pathways of the host involved the response to the ingestion of a probiotic strain. This response was assessed by conducting a global transcriptomic analysis by high throughput sequencing of messenger RNAs from *C. elegans*. This analysis was completed by the study of longevity and survival to the infection of mutant worms to identify key genes necessary for Lcr35® probiotic effects. Moreover, some authors having shown a causal relationship between probiotics, oxidative stress and longevity [**16**], [**17**], a research of

Preliminary draft

the antioxidant effect of Lcr35® in the host was carried out. The works presented here represent the first study highlighting the anti *C. albicans* mechanisms of action of a *Lactobacillus* using the preclinical model *C. elegans*.

3 Material and methods

3.1 Microbial strains and growth conditions

The microbial strains were grown as described in our previous work [**14**]. Briefly, the *E. coli* OP50 strain was provided by the *Caenorhabditis* Genetics Center (Minneapolis, MN, USA) and was grown on Lysogeny Broth (LB, Miller's Modification) (Conda, Madrid, Spain) at 37 °C overnight. The *L. rhamnosus* Lcr35® strain was provided by biose® (Aurillac, France) and was grown in de Man, Rogosa, Sharpe (MRS) broth (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) at 37 °C overnight. *C. albicans* ATCC® 10231™ was grown in yeast peptone glucose (YPG) broth pH 6.5 (per L: 10 g yeast extract, 10 g peptone, 20 g glucose) at 37 °C for 48 h. Microbial suspensions were spun down for 2 min at 1,500 rpm (Rotofix 32A, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany) and washed with M9 buffer (per L: 3 g KH_2PO_4, 6 g Na_2HPO_4, 5 g NaCl, 1 mL 1 M $MgSO_4$) to obtain a final concentration of 100 mg.mL^{-1}.

3.2 *Caenorhabditis elegans* maintenance

C. elegans N2 (wild-type), CB1370 (*daf-2*(e1370) III), GR1307 (*daf-16*(mgDf50) I), KU4 (*sek-1*(km4) X), LG333 (*skn-1*(zu135) IV;gels7) and VC8 (*jnk-1*(gk7) IV) strains were acquired from the *Caenorhabditis* Genetics Center. The nematodes were grown and maintained at 20 °C (15 °C for the CB1370 strain) on nematode growth medium (NGM) (per L: 3 g NaCl; 2.5 g peptone; 17 g agar; 5 mg cholesterol; 1 mM $CaCl_2$; 1 mM $MgSO_4$, 25 mL 1 M potassium phosphate buffer at pH 6) plates supplemented with yeast extract (4 g.L^{-1}) (NGMY) and seeded with *E. coli* OP50 [**18**].

3.3 *Caenorhabditis elegans* synchronization

The synchronization was performed as described in our previous work [**14**]. Briefly, to avoid variations in results due to age differences, a worm synchronous population was required.

Preliminary draft

Gravid worms were washed off using M9 buffer and spun down for 2 min at 1,500 rpm. Five millilitres of worm bleach (2.5 mL of M9 buffer, 1.5 mL of bleach, 1 mL of 5 M sodium hydroxide) was added to the pellet and vigorously shaken until adult worm body disruption. The action of worm bleach was stopped by adding 20 mL of M9 buffer. The egg suspension was then spun down for 2 min at 1,500 rpm and washed twice with 20 mL of M9 buffer. Eggs were allowed to hatch under slow agitation at 25 °C for 24 h in approximately 20 mL of M9 buffer. L1 larvae were then transferred onto NGMY plates seeded with *E. coli* OP50 until they reached the L4/young adult stage.

3.4 Oxidative stress assays on agar plates

The aim is to characterize the potential antioxidant activity of the Lcr35® probiotic strain on *C. elegans* N2 (wild-type) as described by Grompone *et al.* [**16**]. Briefly, 100 microliters microliters of Lcr35® or *E. coli* OP50 suspension (100 mg.mL^{-1}) were spread on peptone-free NGM + 0.12 mM FUdR (6-well plate) and incubated at 37 °C overnight. Synchronized L4 / young adult worms were transferred onto each well and incubated at 20 °C for 5 days and then transferred onto either peptone-free NGM (control) or peptone-free NGM with 3 mM H_2O_2 (Acros organics, Geel, Belgium). After 3.5 h of incubation, worm viability was scored and the survival rate σ_r was calculated using the following formula:

$$\sigma_r = \frac{\left(\frac{N_{\text{worms alive at t=3.5 hours}}}{N_{\text{worms alive at t=0 hour}}}\right)_{\text{on NGM with } H_2O_2}}{\left(\frac{N_{\text{worms alive at t=3.5 hours}}}{N_{\text{worms alive at t=0 hour}}}\right)_{\text{on NGM without } H_2O_2}}$$

An animal was scored as dead when it did not respond to a gentle mechanical stimulation. This assay was performed as three independent experiments with three plates per condition. Differences between conditions were determined by an unpaired t test using GraphPad Prism version 8.2.0 for macOS. A *p*-value ≤ 0.05 was considered as significant.

3.5 *C. elegans* lifespan assay

The lifespan assay was performed as described in our previous work [**14**]. Synchronous L4 worms were transferred to NGMY with 0.12 mM 5-fluorodeoxyuridine FUdR (Sigma, Saint-Louis, USA) to avoid egg hatching and seeded with 100 µL of microbes at 100 mg.mL^{-1}

Preliminary draft

158 microbial strain (~50 worms per plate) as previously stated. The plates were kept at 20 °C (15
159 °C for the CB1370 strain), and live worms were scored each day until the death of all animals.
160 An animal was scored as dead when it did not respond to a gentle mechanical stimulation.
161 This assay was performed as three independent experiments with three plates per condition.
162 The *C. elegans* lifespan assay was examined using the Kaplan-Meier method, and differences
163 were determined using the log-rank test with R software version 3.5.0 [**19**], and the *survival*
164 [**20**] and *survminer* [**21**] packages. A *p*-value ≤ 0.05 was considered significant.

165 ### 3.6 Effects of *L. rhamnosus* Lcr35® on candidiasis in *C. elegans*

166 Sequential feeding with Lcr35® and *C. albicans* were induced in *C. elegans* in all experiments.
167 As control groups, monotypic contamination was induced in *C. elegans* by inoculation with only
168 *C. albicans*, Lcr35® or *E. coli* OP50. This experiment was performed as described in our
169 previous work [**13**].

170 #### 3.6.1 Preparation of plates containing probiotic bacteria or pathogenic yeasts

171 One hundred microlitersmicroliters of Lcr35® or *E. coli* OP50 suspension (100 mg.mL^{-1}) was
172 spread on NGMY + 0.12 mM FUdR plates and incubated at 37 °C overnight. Concerning *C.*
173 *albicans* strains, 100 µL of suspension was spread on Brain Heart Infusion BHI (Biokar
174 Diagnostics, Beauvais, France) + 0.12 mM FUdR plates and incubated at 37 °C overnight.

175 #### 3.6.2 Survival assay: preventive treatment

176 The survival assay was performed according to the work of de Barros [**12**], with some
177 modifications. During a preventive treatment, young adult worms were placed on plates
178 containing Lcr35® at 20 °C for 4 h. Next, the worms were washed with M9 buffer to remove
179 bacteria prior to being placed on *C. albicans* plates for 2 h at 20 °C. Infected nematodes were
180 washed off plates using M9 buffer prior to being transferred to a 6-well microtiter plate
181 (approximately 50 worms per well) containing 2 mL of BHI/M9 (20%/80%) + 0.12 mM FUdR
182 liquid assay medium per well and incubated at 20 °C (15°C for the CB1370 strain). For the
183 control groups (i.e., *E. coli* OP50 + *C. albicans*, *E. coli* OP50 only, Lcr35® only and *C. albicans*
184 only), worms were treated in the same way. Nematodes were observed daily and were

Preliminary draft

185 considered dead when they did not respond to a gentle mechanical stimulation. This assay
186 was performed as three independent experiments containing three wells per condition.
187 The *C. elegans* survival assay was examined using the Kaplan-Meier method, and differences
188 were determined using the log-rank test with R software version 3.5.0 [**19**], and the *survival*
189 [**20**] and *survminer* [**21**] packages. A *p*-value ≤ 0.05 was considered significant.

190 ### 3.7 *C. elegans* whole transcriptome modulation analysis

191 #### 3.7.1 Sample preparation for RNA analysis

192 The RNA isolation was performed as described in our previous work [**14**]. Briefly, worms were
193 fed with either with a single strain (*E. coli* OP50 or Lcr35® or *C. albicans*) or two strains
194 successively (*E. coli* OP50 or Lcr35® first to *C. albicans*). Approximately 10,000 worms (N2
195 strain) were harvested from NGMY plates with M9 buffer. Total RNA was extracted by adding
196 500 µL of TRIzol reagent (Ambion by Life Technologies, Carlsbad, USA). Worms were
197 disrupted using a Precellys (Bertin Instruments, Montigny-le-Bretonneux, France) and glass
198 beads (PowerBead Tubes Glass 0.1 mm, Mo Bio Laboratories, USA). Beads were removed
199 by centrifugation at 14,000 rpm for 1 min (Eppendorf® 5415D, Hamburg, Germany), and 100
200 µL of chloroform were added to the supernatant. Tubes were vortexed for 30 seconds and
201 incubated at room temperature for 3 min. The phenolic phase was removed by centrifugation
202 at 12,000 rpm for 15 min at 4 °C. The aqueous phase was treated with chloroform as previously
203 described. RNA was precipitated by adding 250 µL of isopropanol for 4 min at room
204 temperature and spun down at 12,000 rpm for 10 min (4 °C). The supernatant was discarded,
205 and the pellet was washed with 1,000 µL of 70% ethanol. The supernatant was discarded after
206 centrifugation at 14,000 rpm for 5 min (4 °C), and the pellet was dissolved in 20 µL of RNase-
207 free water.
208 Any DNA present in the samples was removed using the DNase treatment and removal kit
209 (Invitrogen). Ten micrograms of RNA were mixed with 5 µL of 10X buffer, 0.5 µL of DNAse and
210 35 µL of RNAse-free water and incubated at 37 °C for 30 min. Then, 0.5 µL of DNAse were
211 added and incubated again at 37 °C for 30 min. Afterwards, DNAse was inactivated by added

Preliminary draft

5 µL of DNAse Inactivation Reagent, mixed thoroughly and incubated for 2 min at room temperature. The samples were centrifuged for 2 min at 10 000 rpm (Beckman J2-MC, Beckman Coulter, Brea, USA) and the supernatants were transferred into clean Eppendorf tubes.

The concentration of RNA in each sample was assessed with a Nanodrop 2000c spectrophotometer (Termo Scientific) and the quality was evaluated using an Agilent 2100 Bioanalyzer system (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Samples were stored at -80 °C until use.

3.7.2 Determination of *C. elegans* transcription modulation by RNA sequencing

The following steps were performed by the MGX Platform (Montpellier GenomiX, CNRS, Montpellier, France) using Illumina kits, devices and softwares (Illumina Inc, San Diego, USA): construction of the mRNA library using a TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation Kit; cluster generation with the cBot system using a Cluster Generation Kit; hybridization of the sequencing primer on the flow-cell; 50-bp single-read sequencing using a HiSeq 2500 device with Sequence by Synthesis technology; informatic pretreatments, i.e., image analysis with the HiSeq Control Software and Real-Time Analysis component, base-calling with the RTA software and demultiplexing with bcl2fastq. The RNAseq data are available XXX. The quality scores across all bases of all reads and the N (non-attributed bases) content across all bases were determined for each condition with the FastQC software from the Babraham Institute. The research of contaminants is carried out using FastQ Screen.

The reads were aligned on reference genomes using Bowtie2 software: *C. elegans* (WBcel235, UCSC), and *C. albicans* SC5314 Assembly 22 (Candida Genome Database). Reads which did not aligned on *C. elegans* genome were excluded from further analysis. Retained reads were counted using featureCounts software (version 1.6.4) and analysis of differential expression was achieved by the package DESeq2. Gene expression changes with adjusted *p*-value of less than 0.05 were declared differentially expressed and considered for further analysis.

Preliminary draft

Using significantly differentially expressed genes (adjusted p-value less than 0.05), a Gene Ontology analysis was performed. For this, the genes were sorted according to their expression (under-expression or over-expression) and according to whether the worms were in contact with a single microbial strain or a sequential culture. The lists obtained were then analyzed using the R topGO package [**22**]. Three levels of analysis were considered: biological process, molecular function and cellular component. Only the GO terms significantly enriched (Fisher test, p <0.05) were retained and represented graphically using the WEGO online interface (http://wego.genomics.org.cn/).

4 Results

4.1 Impact of Lcr35® or *C. albicans* single strains on *C. elegans* whole transcriptome

Differential analysis of the *C. elegans* transcriptome (Figure 1) showed that *L. rhamnosus* Lcr35® induced the overexpression of 132 genes and the repression of 30 genes, significantly. In contrast, the pathogen *C. albicans* caused overexpression in 43 genes and repression in 153 genes. We have also noticed that 25 genes are overexpressed and 5 genes are repressed both in the presence of bacteria and yeast.

In the presence of *C. albicans* (Figure 2 (a)), we observed a significant enrichment of the biological processes involved in lipid catabolism (carboxylic acid metabolic process and fatty acid β oxidation), in the transport of lipids, in the redox activity (cellular aldehyde metabolic process) and the carbohydrate anabolism via the glyoxylate cycle. The oxidative catabolism was pointed out by molecular functions like lyase, aldehyde dehydrogenase (NAD) and transporter activity. Likewise, this was associated with the cellular component of the peroxisome. In addition, we noticed a significant enrichment of terms related to intestinal development and cuticle synthesis. On the other hand, if we consider the downregulated genes (Figure 2 (b)), we noted that they were mainly involved in processes related to the reproduction and development of germ lines. From a molecular point of view, we have noticed an over-representation of hydrolytic functions (ether and epoxide hydrolase) and binding. These

Preliminary draft

molecular functions involve cell compartments in connection with gametes (yolk) and membrane structures (external encapsulating structure, side of membrane).

In the presence of the *L. rhamnosus* Lcr35® strain, the overexpressed genes (Figure 3 (a)) were involved in totally different biological processes and were rather structural in nature. Indeed, we observed a significant enrichment of the terms related to the synthesis of the cuticle (collagen and cuticulin) and the molting phenomenon. Similar GO terms were also found at the level of molecular functions, in particular with the terms "structural molecule activity" and "structural constitute cuticle activity". The extracellular compartment and the collagen matrix were particularly represented. We still noted ontologies related to metabolic and signaling activities including the (negative) regulation of the insulin pathway DAF-2 / DAF-16, the metabolism of organic acids and the storage of lipids. As for the under-regulated genes (Figure 3 (b)), they are more involved in metabolic activities with the negative regulation of protein metabolism, the negative regulation of translation as well as cellular homeostasis. From a molecular point of view, we noted that the genes are also related to hydrolytic activities including phosphoesters, binding of messenger RNAs and proteins, and RNA helicase activity, which is correlated with the regulation of translation. Some of these ontologies are related to ribonucleoprotein complexes as well as germline (yolk granules, P granules).

We also compared worm transcriptomes in the presence of *L. rhamnosus* Lcr35® and *C. albicans*. In the same way as previously, our results showed that *C. albicans* induces the activation of metabolic processes (Figure 4 (a)) notably in connection with the biosynthesis of quinolinate, a dicarboxylic acid with a pyridine backbone and a tryptophan degradation product. This metabolic activity is also highlighted by a significant enrichment of the metabolic functions associated with membrane transporters (symporter) and enzymatic activities lyase, hydratase and decarboxylase. Peroxisome and membrane structures seem to be involved in these processes. With respect to *L. rhamnosus* Lcr35® (Figure 4 (b)), it is again the structural response that is significantly enriched with terms related to cuticle and molting. In addition, other molecular functions such as alkyl transferases and hydrolases acting on the carbon-nitrogen but non-peptide bonds appeared in the GO terms.

Preliminary draft

4.2 Impact of a candidiasis preventive treatment on *C. elegans* whole transcriptome

Sequentially incubating *C. elegans* with *E. coli* OP50 or *L. rhamnosus* Lcr35® and then with *C. albicans* induced modifications to the host transcriptome as compared to incubation on a single strain (Figure 5). However, we note that 72 genes (27.4%) significantly over-expressed are in common in at least two different experimental conditions. In addition, differential analysis showed that a majority of genes were expressed specifically when the worm has been in contact with Lcr35® (alone or preventively). Interestingly, we noticed that the genes significantly repressed in the nematode, were specific to the condition considered. Only three genes are commonly downregulated by the preventive treatment with Lcr35® and by *C. albicans*.

Comparison of the preventive treatment with Lcr35® compared to that with *E. coli* OP50 showed that significantly under-regulated genes were not involved in any particular ontology. For the overexpressed genes, we noted that they were involved in two major biological processes (Figure 6): the longevity of the host (determination of adult lifespan and multicellular organism aging) as well as the response to a biotic stress (response to external biotic stimulus and defense response to Gram-positive bacterium). However, the analysis did not reveal any significant enrichment in molecular functions or cellular components.

4.3 *C. elegans* lifespan assay

We investigated the effects of the probiotic Lcr35® on lifespan of *C. elegans* loss-of-function mutant strains. We targeted five strains carrying mutations on genes belonging to three different regulatory pathways: the insulin pathway (*daf-2* and *daf-16*), the p38 MAPK pathway (*sek-1* and *skn-1*), and the JNK pathway (*jnk-1*). In the case of mutants of the insulin pathway, we did not observe a significant difference ($p = 0.7$) in the longevity of *daf-2* nematodes (Figure 7 A) according to whether they were fed with *E. coli* OP50 or Lcr35®. Conversely, for the mutant *daf-16* (Figure 7 B), we note a significant difference ($p = 0.008$). This difference is not visible on median survival or longevity but in the presence of Lcr35®, a larger proportion of the population survived longer. Regarding the mutants of the p38 MAPK pathway, we did not

Preliminary draft

observe any significant difference in the longevity of both nematodes *sek-1* ($p = 0.9$) and *skn-1* ($p = 0.07$). On the other hand, we have demonstrated a significant increase in the longevity ($p < 2.10^{-16}$) of the *jnk-1* mutant of 14.3% and the median survival of 30%, in the presence of Lcr35®.

4.4 *C. elegans* survival assay

During this experiment, our goal was to determine the impact of mutations on the DAF-2 / DAF-16 and p38 MAPK signaling pathways on Lcr35® anti-*C. albicans* properties.

In the case of a mutation on the *daf-2* gene (Figure 8A), we observed a significant decrease in the survival of *C. elegans* in the presence of *C. albicans* ($p = 1.10^{-7}$) with a reduction of 11.1 % of median survival. The longevity of the host was significantly increased to 25 days in the presence of Lcr35® ($p = 8.10^{-6}$). In addition, mortality in the population was observed only after 17 days. For preventive treatment with *E. coli* OP50, we did not observe a significant decrease in overall survival of the nematode ($p = 0.1$) although we observed relatively early mortality in the population. Finally, preventive treatment with Lcr35® induced a significant increase ($p = 3.10^{-14}$) in the mean lifespan and in the longevity of the nematodes despite the infection by the pathogen.

If we consider the mutation of the *daf-16* gene (Figure 8B), it induced an increased susceptibility to fungal infection. This resulted in a rapid mortality of worms with a reduction ($p < 2.10^{-16}$) of the median survival and longevity of 66.7% and 37.5% respectively. As for the presence of the LBM Lcr35®, this allowed only a small increase in the overall survival of the animal ($p = 0.02$). Also, when a preventive treatment with *E. coli* OP50 was applied, it did not involve any modification of nematode survival compared to the control condition *E. coli* OP50 ($p = 0.1$). In contrast, Lcr35® as a preventative treatment resulted in a significant decrease in host survival ($p < 2.10^{-16}$) with a 50% reduction in mean lifespan and a 25% reduction in longevity.

With the mutation on the gene *sek-1* (Figure 8C), we found that the pathogen *C. albicans* and the LBM Lcr35® induced results similar to the conditions where the worm was mutated for the gene *daf-16* (respectively $p < 2.10^{-16}$ and $p < 2.10^{-16}$). Since worms were treated preventively

Preliminary draft

with *E. coli* OP50, we emphasized that survival of the nematode was significantly negatively impacted ($p < 2.10^{-16}$) with a 60% reduction in mean lifespan. Moreover, there was no significant difference ($p = 0.2$) in terms of survival, depending on whether the worms received preventive treatment with *E. coli* OP50 or Lcr35®.

Finally, with the mutant *skn-1* (Figure 8D), as before, we noted similar trends for worms in the presence of *C. albicans* ($p = 3.10^{-7}$) and Lcr35® ($p < 2.10^{-16}$). If we considered the preventive treatment with *E. coli* OP50, we noted that it did not induce any significant difference in the survival of the host ($p = 0.3$). On the other hand, a preventive treatment with Lcr35® allowed a significant increase in the longevity of the nematode ($p = 3.10^{-12}$).

4.5 Antioxidant assay

In order to examine the antioxidant properties of Lcr35®, we fed the worms (wild-type) with the probiotic and we tested *C. elegans* survival rate σ_r upon H_2O_2-induced stress. This was performed by measuring worm viability after 3,5 hours on hydrogen peroxide. We observed a significant decrease ($p = 0.002$) in the survival rate of nematodes according to whether they were previously fed with the control strain *E. coli* OP50 (87.5 ± 5.5%) or the probiotic Lcr35® (30.2 ± 5.7%), with a loss of viability of 65.5% (Figure 9).

5 Discussion

Numerous studies have demonstrated the interest of *C. elegans* implementation in order to screen collections of microorganisms and to identify potential candidates with probiotic properties [**12**], [**23**], [**24**]. For strains with a proven probiotic character, *C. elegans* is also a relevant model for the conduct of mechanistic studies [**13**], [**14**], [**25**] due to the availability of a large collection of mutants and, because of its genetic and protein homologies with humans [**26**]. Likewise, the nematode constitutes a tool allowing the investigation of the pathogenicity of human microorganisms, whether they are bacterial [**27**], [**28**] or fungal [**11**], [**29**], [**30**].

Although some authors have been able to demonstrate the involvement of certain regulatory pathways during the microbial strain probiotic effect, very few studies have been conducted in order to comprehensively decipher these mechanisms by high-throughput methods (DNA

Preliminary draft

micro-array, NGS). In their review, Dierking *et al.* pointed out that non-pathogenic bacteria, like *L. rhamnosus*, had no overall impact on the expression of genes coding for molecules with antimicrobial activity. Only the *spp-6* (up-regulation), *spp-16*, *spp-23*, *lys-1* and *lys-6* (down-regulation) genes have their expressions modulated [**31**]. More specifically, a study focused on the impact of the *L. rhamnosus* CNCM I-3690 strain on the transcriptome of *C. elegans*. The authors then highlighted that a large number of overexpressed genes (*lec-11*, *spp-16*, *clc-1*, *gst-22*, *fat-7*, *acl-12*, *hsp-12.3*) in young worms were involved in the insulin-like pathway, in lipid metabolism as well as in the stress response [**16**].

Unlike the properties of probiotics, the pathogenesis of microorganisms, in particular *C. albicans*, is rather well described in the literature, in particular thanks to the work of Pukkila-Worley and colleagues [**11**]. After a fungal infection, a rapid transcriptional response takes place in the nematode via the modulation of 313 genes, approximately 1.6% of the genome. Most of these genes encode for antimicrobial molecules as well as secreted or detoxifying proteins. Among these genes the authors have shown the overexpression of antimicrobial genes such as *abf-2*, *cnc-4*, *cnc-7*, *fipr-22* and *fipr-23*. With the exception of *abf-2*, all these genes are under the control of PMK-1, whose inactivation makes the nematode susceptible to the infection. Likewise, the authors demonstrated the high degree of specificity of the nematode's immune response. Indeed, only a few genes overexpressed in the presence of *C. albicans* are also expressed with the bacteria *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. Also, they have shown that most genes induced by bacteria are repressed in the presence of yeast. More recently, Sun *et al.* revealed that during *C. albicans* infection, dysregulation of microRNA expression (miRNAs) occurred. The authors suggested that three miRNAs, *mir-251*, *mir-252* and *mir-360*, play an essential role in controlling the regulation of nematode immunity. A loss of function of the first two genes induces an increased resistance to infection while for the last, a susceptibility is observed. Also, the authors indicate that *mir-251* and *mir-252* appear to function downstream of the p38 MAPK pathway or insulin-like [**32**]. In addition, these two genes are homologous of the human miRNA *mir-26* [**33**].

Preliminary draft

So far, a large number of lactic acid bacteria with probiotic properties have been studied in the *C. elegans* worm with the major result of extending the longevity of the host. However, as noted in the review by Roselli and colleagues [**34**], few studies have allowed the characterization of the molecular mechanisms involved. Otherwise, probiotics effects involve the insulin-like pathway (DAF-2 / DAF-16) [**13**], [**14**], [**16**], [**35**] or the canonical p38 MAPK signaling pathway [**14**], [**36**], [**37**]. In *C. elegans*, DAF-16 is closely related to mammalian FOXO3a, a transcription factor involved in the inflammatory process [**38**] and leading to the modulation of the worm's health condition and consequently to its lifetime [**32**]. The p38 MAPK (also called PMK-1) pathway is activated through phosphorylation by upstream MAPKK (SEK-1), which is activated by MAPKKK (NSY-1). It has a role in regulating life expectancy by modulating the specific immune response of the worm and has been shown to be required in its resistance to bacterial infection [**39**].

More marginally, some authors have highlighted the involvement of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway in the presence of probiotics not belonging to the genus *Lactobacillus* [**40**]. The JNK (c-Jun N-terminal Kinase) pathway is activated by cytokines and in response to stresses such as UV irradiation, Reactive Oxygen Species (ROS), DNA damage, heat stress and inflammation [**41**]. In *C. elegans*, this pathway evolves in parallel with the insulin signaling pathway till it converges to DAF-16 which is phosphorylated by JNK-1 [**42**]. Beyond the extension of longevity, probiotics also exert an antipathogenic activity via mainly the three previously mentioned pathways but also via the TGF-β, β-catein and AMPK pathways [**24**], [**43**], [**44**]. Implementation experience on longevity and survival against the fungal infection with loss-of-function mutants allowed us to highlight the implication of different target genes in presence of Lcr35®. Indeed, a mutation leading to a loss of function of *jnk-1* did not lead to a reduction in the longevity of nematodes in the presence of Lcr35®, thus refuting the involvement of the JNK pathway in the prolongevity properties of the LBM. Conversely, we demonstrated the *daf-2*, *daf-16*, *sek-1* and *skn-1* genes were involved in the Lcr35® prolongevity mechanism. This is explained by the absence of a significant increase in the longevity of *C. elegans* in presence of probiotic. Caution is still required for *daf-16* since we

Preliminary draft

observed a delay in the onset of mortality but not an impact of lifespan. In addition, the loss of function in *daf-16* and *sek-1* mutants strongly impacted the anti-*C. albicans* protective properties of Lcr35®. In these cases, in addition to having a high susceptibility to fungal infection, the presence of Lcr35® did not provide effective protection of the host. Conversely, the antifungal abilities of Lcr35® were conserved in the *daf-2* and *skn-1* mutants, which suggests that these two genes play no role in the anti- *C. albicans* effects. Also, we noticed that these two mutants showed a notable resistance to the pathogenic yeast. These results support our previous study where we showed by quantitative RT-PCR that Lcr35® stimulated the host response through the insulin-like and p38 MAPK pathways [**14**].

Aerobic metabolism inexorably leads to the production of oxidative metabolites, such as reactive oxygen species, which are harmful to cells. An imbalance between these metabolites and detoxification mechanisms (for example superoxide dismutase, catalase, etc.) induces damage to DNA, lipids and proteins, which can lead to cell death. However, in low concentrations, they have been shown to be beneficial and promote increased longevity. This is particularly the case in *C. elegans* [**45**]. Recently, Hu and colleagues have shown the involvement of the nuclear hormone receptor 29 (NHR-29) and SKN-1 (p38 MAPK signaling pathway) transcription factors in the animal's response to oxidative stress. The authors hypothesized that NHR-29 induces co-regulation of SKN-1 via its cofactor MDT-5 [**46**]. Lactic acid bacteria have a very active oxidative metabolism and must have detoxification enzymes in order to protect themselves from the deleterious effects of oxidizing species. Grompone *et al.* have screened a collection of lactobacilli and have shown that only a few strains protect C. elegans from oxidative stress, including the strain *L. rhamnosus* CNCM I-3690. Consumption of this bacterium by the worm activates genes downstream of the DAF-16/FOXO pathway [**16**]. During our work, we showed that Lcr35® does not allow the worm to resist hydrogen peroxide despite the fact that it induces the activation of DAF-16 [**13**], [**14**]. Therefore, it turns out that the genes under the control of DAF-16 are not regulated solely by this transcription factor but that a more complex control mechanism exists and must be described. A recent study has shown that the bacterium *L. fermentum* promotes the longevity of the worm in a dependent

Preliminary draft

manner with PEPT-1, a peptide involved in the regulation of lipid content, while resistance to oxidative stress is independent of it [**45**].

The results presented here as part of the preventive treatment of candidiasis with Lcr35® constitutes an important technical and scientific advance. Indeed, no data concerning such an approach is available in the literature. Our method allows the creation of the first data set obtained by high-throughput transcriptomic analysis of the interaction between three organisms: a probiotic, a pathogen and a host. These new insights will heed to new studies to allow understanding of the mechanisms with the ultimate aim of significantly improving the effectiveness of anti-infective drug treatments.

6 Conclusion

In conclusion, we showed the specific transcriptional response of the nematode which is dependent of the microorganism encountered, either the LBM or the pathogen or both sequentially in a preventive approach of fungal infection. Overall, it turns out that *C. albicans* tended to induce a metabolic response (catabolism and anabolism of small metabolites) while Lcr35® rather induced a structural response (cuticle synthesis), which is consistent with the hypothesis of a strengthening of the physical defenses of the host by the probiotic. Furthermore, our results demonstrated that *L. rhamnosus* Lcr35® required functional genes from highly conserved signaling pathways to exert prolongevity and anti *C. albicans* effects to the roundworm *C. elegans*. We found that Lcr35® significantly stimulates *C. elegans* longevity through DAF-2 / DAF-16 and p38 MAP kinase signaling pathways but not through JNK / DAF-16 signaling pathway nor antioxidant effect. Moreover, this interpretation is strengthened by the finding that the first two signaling pathways are also implied in the anti-candidiasis effects which supports the results obtained during our previous work. Hence, next studies are needed to evaluate the impact precisely of Lcr35® (alone or as a preventive treatment) on the proteome and metabolome of *C. elegans* in order to obtain a more global and integrative vision of the mechanisms of action of LBM Lcr35®, ranging from the expression of a gene of interest up to the synthesis of the metabolite through their regulations. Finally, these insights could be

Preliminary draft

transposed to the in-depth study of the action mechanisms of other *Lactobacillus* spp. against *Candida* spp. or other pathogens.

7 Author Contributions

C.P., E.R., S.T., and G.C. designed the protocols and scientific approaches. C.P., E.R., S.T., G.C., E.G. and S.R. carried out the experiments. M.B., P.V., C.C. and S.B. provided critical feedback. C.P. wrote the manuscript. A.N. and S.B. supervised the project.

All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

8 Funding

This work was supported by the European funds FEDER and the Auvergne Rhône Alpes Region in the form of grants to C.P. as well as biose® as part of the doctoral thesis of C.P. The funder biose® provided support in the form of salaries for A.N.

9 Acknowledgments

This work was supported by the European funds FEDER, the Auvergne Rhône Alpes Region and biose® as part of the doctoral thesis of Cyril Poupet.

MGX acknowledges financial support from France Génomique National infrastructure, funded as part of “Investissement d’avenir” program managed by Agence Nationale pour la Recherche (contract ANR-10-INBS-09).

Some strains were provided by the CGC, which is funded by NIH Office of Research Infrastructure Programs (P40 OD010440).

We thank Caroline Dausset for the analysis of the messenger RNAs integrity.

We thank greatly all those who took part in the writing of this article.

10 Conflicts of interest

The funders (the European union, the Auvergne Rhône Alpes and biose® Industrie), had no role in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

Preliminary draft

11 References

[1] P. Sornplang and S. Piyadeatsoontorn, "**Probiotic isolates from unconventional sources: a review,**" *J. Anim. Sci. Technol.*, vol. 58, no. 1, pp. 1–11, 2016.

[2] P. van Baarlen, J. M. Wells, and M. Kleerebezem, **"Regulation of intestinal homeostasis and immunity with probiotic lactobacilli,"** *Trends in Immunology*, vol. 34, no. 5. pp. 208–215, May-2013.

[3] V. Lazar, L. M. Ditu, G. G. Pircalabioru, I. Gheorghe, C. Curutiu, A. M. Holban, A. Picu, L. Petcu, and M. C. Chifiriuc, **"Aspects of gut microbiota and immune system interactions in infectious diseases, immunopathology, and cancer,"** *Frontiers in Immunology*, vol. 9, no. AUG. Frontiers Media S.A., 15-Aug-2018.

[4] FAO and WHO, "**Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria,**" *Food Nutr. Pap.*, 2001.

[5] S. M. Dreher-Lesnick, S. Stibitz, and P. E. Carlson, Jr., "**U.S. Regulatory Considerations for Development of Live Biotherapeutic Products as Drugs,**" *Microbiol. Spectr.*, vol. 5, no. 5, pp. 1–6, 2017.

[6] E. Metchikoff, "**The prolongation of life: optimistic studies,**" *G.P. Putnam's Sons*, 1908.

[7] P. M. Meneely, C. L. Dahlberg, and J. K. Rose, " **Working with Worms: Caenorhabditis elegans as a Model Organism ,**" *Curr. Protoc. Essent. Lab. Tech.*, vol. 19, no. 1, pp. 1–35, 2019.

[8] C. H. Lai, C. Y. Chou, L. Y. Ch'ang, C. S. Liu, and W. Lin, "**Identification of novel human genes evolutionarily conserved in *Caenorhabditis elegans* by comparative proteomics.,**" *Genome Res.*, vol. 10, no. 5, pp. 703–13, May 2000.

[9] D. J. Feistel, R. Elmostafa, N. Nguyen, M. Penley, L. Morran, and M. A. Hickman, " **A Novel Virulence Phenotype Rapidly Assesses Candida Fungal Pathogenesis in Healthy and Immunocompromised Caenorhabditis elegans Hosts ,**" *mSphere*, vol. 4, no. 2, Apr. 2019.

Preliminary draft

538 [10] A. B. Elkabti, L. Issi, and R. P. Rao, **"Caenorhabditis elegans as a model host to**
539 **monitor the candida infection processes,"** *Journal of Fungi*, vol. 4, no. 4. MDPI AG,
540 2018.
541 [11] R. Pukkila-Worley, F. M. Ausubel, and E. Mylonakis, "***Candida albicans* infection of**
542 ***Caenorhabditis elegans* induces antifungal immune defenses,**" *PLoS Pathog.*, vol.
543 7, no. 6, 2011.
544 [12] P. P. de Barros, L. Scorzoni, F. de C. Ribeiro, L. R. de O. Fugisaki, B. B. Fuchs, E.
545 Mylonakis, A. O. C. Jorge, J. C. Junqueira, and R. D. Rossoni, "***Lactobacillus***
546 ***paracasei* 28.4 reduces *in vitro* hyphae formation of *Candida albicans* and**
547 **prevents the filamentation in an experimental model of *Caenorhabditis elegans*,**"
548 *Microb. Pathog.*, vol. 117, no. November 2017, pp. 80–87, 2018.
549 [13] C. Poupet, T. Saraoui, P. Veisseire, M. Bonnet, C. Dausset, M. Gachinat, O. Camarès,
550 C. Chassard, A. Nivoliez, and S. Bornes, "***Lactobacillus rhamnosus* Lcr35 as an**
551 **effective treatment for preventing *Candida albicans* infection in the invertebrate**
552 **model *Caenorhabditis elegans*: First mechanistic insights,**" *PLoS One*, vol. 14, no.
553 11, p. e0216184, Nov. 2019.
554 [14] C. Poupet, P. Veisseire, M. Bonnet, O. Camarès, M. Gachinat, C. Dausset, C.
555 Chassard, A. Nivoliez, and S. Bornes, "**Curative Treatment of Candidiasis by the Live**
556 **Biotherapeutic Microorganism *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35® in the**
557 **Invertebrate Model *Caenorhabditis elegans*: First Mechanistic Insights,**" *Microorg.*
558 *2020, Vol. 8, Page 34*, vol. 8, no. 1, p. 34, Dec. 2019.
559 [15] A. Nivoliez, O. Camares, M. Paquet-Gachinat, S. Bornes, C. Forestier, and P. Veisseire,
560 "**Influence of manufacturing processes on *in vitro* properties of the probiotic**
561 **strain *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35®,**" *J. Biotechnol.*, vol. 160, no. 3–4, pp. 236–
562 241, 2012.
563 [16] G. Grompone, P. Martorell, S. Llopis, N. González, S. Genovés, A. P. Mulet, T.
564 Fernández-Calero, I. Tiscornia, M. Bollati-Fogolín, I. Chambaud, B. Foligné, A.
565 Montserrat, and D. Ramón, "**Anti-Inflammatory Lactobacillus rhamnosus CNCM I-**

Preliminary draft

566 **3690 Strain Protects against Oxidative Stress and Increases Lifespan in**
567 **Caenorhabditis elegans,**" *PLoS One*, vol. 7, no. 12, 2012.
568 [17] M. M. Senchuk, D. J. Dues, C. E. Schaar, B. K. Johnson, Z. B. Madaj, M. J. Bowman,
569 M. E. Winn, and J. M. Van Raamsdonk, "**Activation of DAF-16/FOXO by reactive**
570 **oxygen species contributes to longevity in long-lived mitochondrial mutants in**
571 **Caenorhabditis elegans,**" *PLoS Genet.*, vol. 14, no. 3, pp. 1–27, 2018.
572 [18] S. Brenner, "**The genetics of *Caenorhabditis elegans*.,**" *Genetics*, vol. 77, no. 1, pp.
573 71–94, 1974.
574 [19] R Core Team, **"R: A language and Environment for Statistical Computing."** R
575 Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2018.
576 [20] T. M. Therneau, **"_A Package for Survival Analysis in S_."** 2015.
577 [21] A. Kassambara and M. Kosinski, **"survminer: Drawing Survival Curves using**
578 **'ggplot2.'"** 2017.
579 [22] A. Alexa and J. Rahnenfuhrer, **"topGO: Enrichment Analysis for Gene Ontology."**
580 2019.
581 [23] R. Chelliah, J.-G. Choi, S.-B. Hwang, B.-J. Park, E. B.-M. Daliri, S.-H. Kim, S. Wei, S.
582 R. Ramakrishnan, and D.-H. Oh, "***In vitro* and *in vivo* defensive effect of probiotic**
583 **LAB against *Pseudomonas aeruginosa* using *Caenorhabditis elegans* model.,**"
584 *Virulence*, vol. 9, no. 1, pp. 1489–1507, 2018.
585 [24] H. K. Lee, S.-H. Choi, C. R. Lee, S. H. Lee, M. R. Park, Y. Kim, M.-K. Lee, and G.-B.
586 Kim, "**Screening and Characterization of Lactic Acid Bacteria Strains with Anti-**
587 **inflammatory Activities through *in vitro* and *Caenorhabditis elegans* Model**
588 **Testing.,**" *Korean J. food Sci. Anim. Resour.*, vol. 35, no. 1, pp. 91–100, 2015.
589 [25] M. R. Park, S. Ryu, B. E. Maburutse, N. S. Oh, S. H. Kim, S. Oh, S. Y. Jeong, D. Y.
590 Jeong, S. Oh, and Y. Kim, "**Probiotic *Lactobacillus fermentum* strain JDFM216**
591 **stimulates the longevity and immune response of *Caenorhabditis elegans***
592 **through a nuclear hormone receptor,**" *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, p. 7441, 2018.
593 [26] J. Zhang, A. D. Holdorf, and A. J. Walhout, **"C. elegans and its bacterial diet as a**

Preliminary draft

model for systems-level understanding of host–microbiota interactions," *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 46. Elsevier Ltd, pp. 74–80, 01-Aug-2017.

[27] S.-B. Hwang, J. Choi, S. Wei, B.-J. Park, R. Chelliah, and D.-H. Oh, "***In vivo* screening platform for shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) using *Caenorhabditis elegans* as a model,**" *PLoS One*, vol. 13, no. 2, p. e0193277, Feb. 2018.

[28] C. D. King, D. Singh, K. Holden, A. B. Govan, S. A. Keith, A. Ghazi, and R. A. S. Robinson, "**Proteomic identification of virulence-related factors in young and aging C. elegans infected with Pseudomonas aeruginosa,**" *J. Proteomics*, vol. 181, pp. 92–103, Jun. 2018.

[29] R. Pukkila-Worley, A. Y. Peleg, E. Tampakakis, and E. Mylonakis, "***Candida albicans* hyphal formation and virulence assessed using a *Caenorhabditis elegans* infection model,**" *Eukaryot. Cell*, vol. 8, no. 11, pp. 1750–1758, 2009.

[30] N. D. Peterson, H. K. Cheesman, P. Liu, S. M. Anderson, K. J. Foster, R. Chhaya, P. Perrat, J. Thekkiniath, Q. Yang, C. M. Haynes, and R. Pukkila-Worley, "**The nuclear hormone receptor NHR-86 controls anti-pathogen responses in C. elegans.,**" *PLoS Genet.*, vol. 15, no. 1, p. e1007935, 2019.

[31] K. Dierking, W. Yang, and H. Schulenburg, "**Antimicrobial effectors in the nematode *Caenorhabditis elegans* : an outgroup to the *Arthropoda*,**" *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 371, no. 1695, p. 20150299, 2016.

[32] L. Sun, L. Zhi, S. Shakoor, K. Liao, and D. Wang, "**microRNAs involved in the control of innate immunity in *Candida* infected *Caenorhabditis elegans*,**" *Sci. Rep.*, vol. 6, no. October, p. 36036, Oct. 2016.

[33] C. Ibáñez-Ventoso, M. Vora, and M. Driscoll, "**Sequence relationships among C. elegans, D. melanogaster and human microRNAs highlight the extensive conservation of microRNAs in biology,**" *PLoS One*, vol. 3, no. 7, 2008.

[34] M. Roselli, E. Schifano, B. Guantario, P. Zinno, D. Uccelletti, and C. Devirgiliis, "**Caenorhabditis Elegans and Probiotics Interactions from a Prolongevity Perspective,**" *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 20, pp. 1–14, 2019.

Preliminary draft

622 [35] T. Ikeda, C. Yasui, K. Hoshino, K. Arikawa, and Y. Nishikawa, "**Influence of lactic acid**
623 **bacteria on longevity of *Caenorhabditis elegans* and host defense against**
624 ***Salmonella enterica* serovar Enteritidis,**" *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 73, no. 20, pp.
625 6404–6409, 2007.
626 [36] H. Nakagawa, T. Shiozaki, E. Kobatake, T. Hosoya, T. Moriya, F. Sakai, H. Taru, and
627 T. Miyazaki, "**Effects and mechanisms of prolongevity induced by *Lactobacillus***
628 ***gasseri* SBT2055 in *Caenorhabditis elegans*,**" *Aging Cell*, vol. 15, no. 2, pp. 227–236,
629 2016.
630 [37] Y. Kim and E. Mylonakis, "***Caenorhabditis elegans* immune conditioning with the**
631 **probiotic bacterium *Lactobacillus acidophilus* strain ncfm enhances gram-**
632 **positive immune responses,**" *Infect. Immun.*, vol. 80, no. 7, pp. 2500–2508, 2012.
633 [38] V. Singh and A. Aballay, "**Regulation of DAF-16-mediated Innate Immunity in**
634 ***Caenorhabditis elegans*.,**" *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 51, pp. 35580–7, Dec. 2009.
635 [39] A. Xu, G. Shi, F. Liu, and B. Ge, "***Caenorhabditis elegans* mom-4 is required for the**
636 **activation of the p38 MAPK signaling pathway in the response to *Pseudomonas***
637 ***aeruginosa* infection,**" *Protein Cell*, vol. 4, no. 1, pp. 53–61, 2013.
638 [40] L. Zhao, Y. Zhao, R. Liu, X. Zheng, M. Zhang, H. Guo, H. Zhang, and F. Ren, "**The**
639 **transcription factor DAF-16 is essential for increased longevity in *C. elegans***
640 **Exposed to *Bifidobacterium longum* BB68,**" *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 7408, 2017.
641 [41] M. Wolf, F. Nunes, A. Henkel, A. Heinick, and R. J. Paul, "**The MAP kinase JNK-1 of**
642 ***Caenorhabditis elegans*: Location, activation, and influences over temperature-**
643 **dependent insulin-like signaling, stress responses, and fitness,**" *J. Cell. Physiol.*,
644 vol. 214, no. 3, pp. 721–729, Mar. 2008.
645 [42] S. Marudhupandiyan and K. Balamurugan, "**Intrinsic JNK-MAPK pathway**
646 **involvement requires *daf-16*-mediated immune response during *Shigella flexneri***
647 **infection in *C. elegans*,**" *Immunol. Res.*, vol. 65, no. 3, pp. 609–621, Jun. 2017.
648 [43] G. J. Yuen and F. M. Ausubel, "**Both live and dead Enterococci activate**
649 **Caenorhabditis elegans host defense via immune and stress pathways,**"

Preliminary draft

650 *Virulence*, vol. 9, no. 1, pp. 683–699, 2018.

651 [44] I. Sim, K. T. Park, G. Kwon, J. H. Koh, and Y. H. Lim, "**Probiotic potential of**
652 ***Enterococcus faecium* isolated from chicken cecum with immunomodulating**
653 **activity and promoting longevity in *Caenorhabditis elegans*,**" *J. Microbiol.*
654 *Biotechnol.*, vol. 28, no. 6, pp. 883–892, Jun. 2018.

655 [45] E. Schifano, P. Zinno, B. Guantario, M. Roselli, S. Marcoccia, C. Devirgiliis, and D.
656 Uccelletti, "**The Foodborne Strain *Lactobacillus fermentum* MBC2 Triggers *pept-1*-**
657 **Dependent Pro-Longevity Effects in *Caenorhabditis elegans*,**" *Microorganisms*, vol.
658 7, no. 2, p. 45, Feb. 2019.

659 [46] Q. Hu, D. R. D'Amora, L. T. MacNeil, A. J. M. Walhout, and T. J. Kubiseski, "**The**
660 **caenorhabditis elegans oxidative stress response requires the NHR-49**
661 **transcription factor,**" *G3 Genes, Genomes, Genet.*, vol. 8, no. 12, pp. 3857–3863,
662 2018.

663

664

Preliminary draft

665

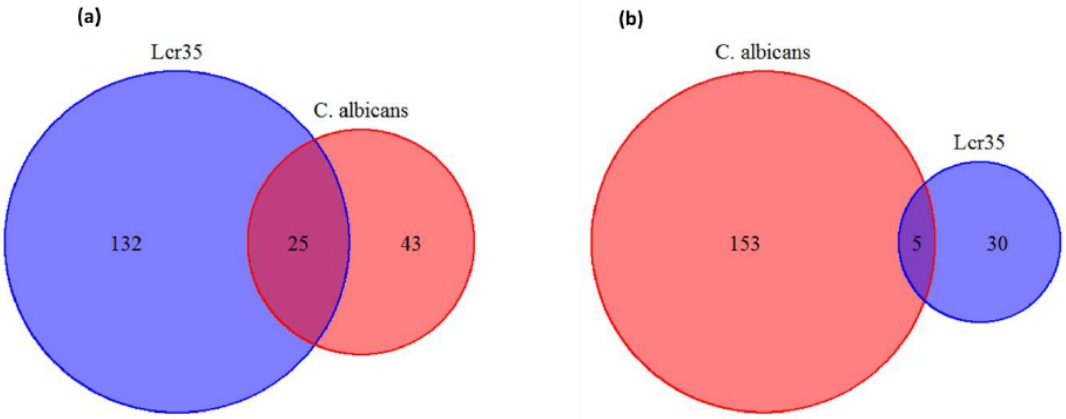


Figure 1: The transcriptional responses to *C. albicans* and *L. rhamnosus* Lcr35® comprise specific and overlapping gene sets. Venn diagrams illustrate the overlap genes significantly upregulated (a) or downregulated (b) by *C. albicans* and *L. rhamnosus* Lcr35®. Animals were exposed to the microbial strains for 4 hours.

Preliminary draft

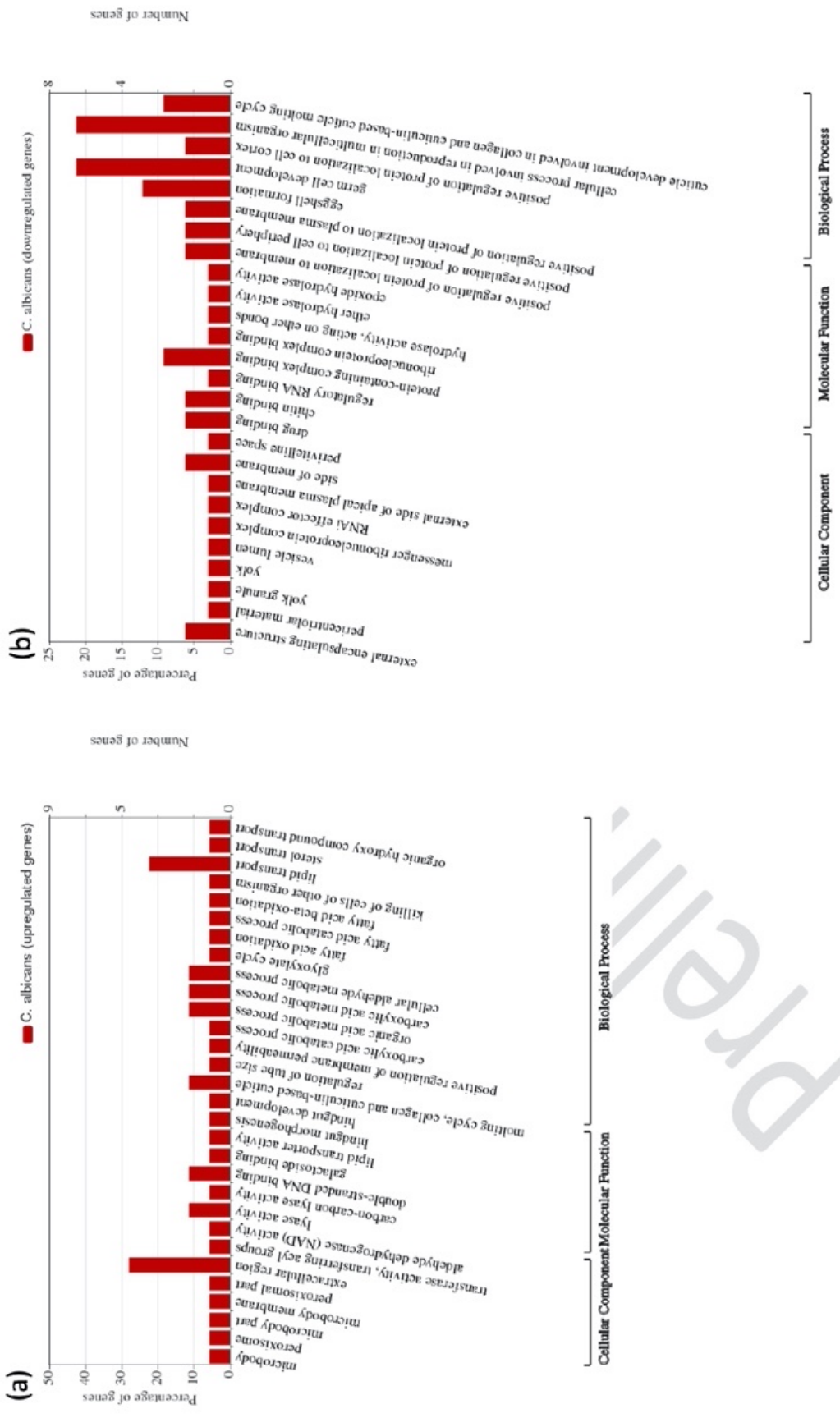


Figure 2: GO analysis of differentially expressed genes in presence of *C. albicans* (control OP50)

Poupet *et al.*

27

Preli

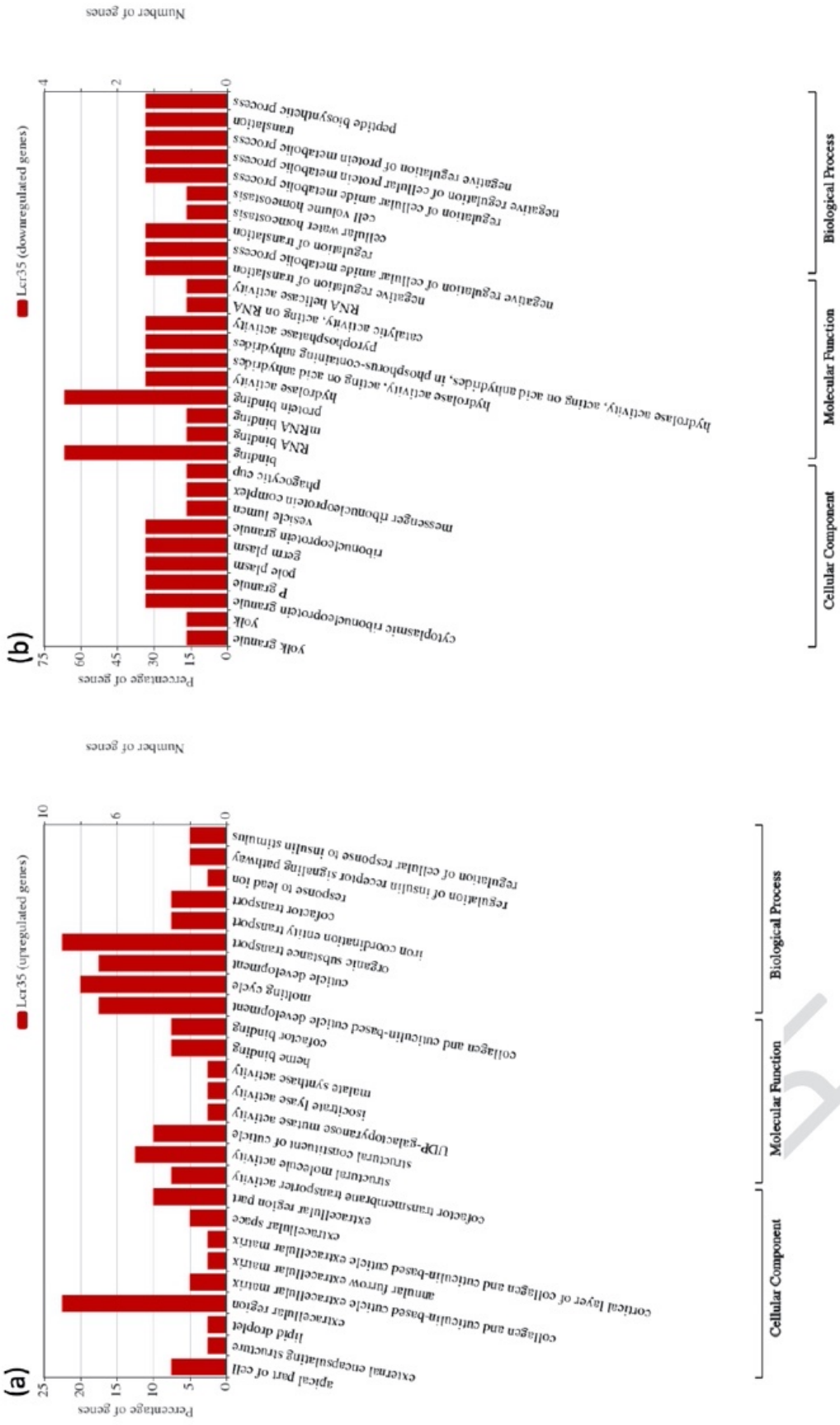
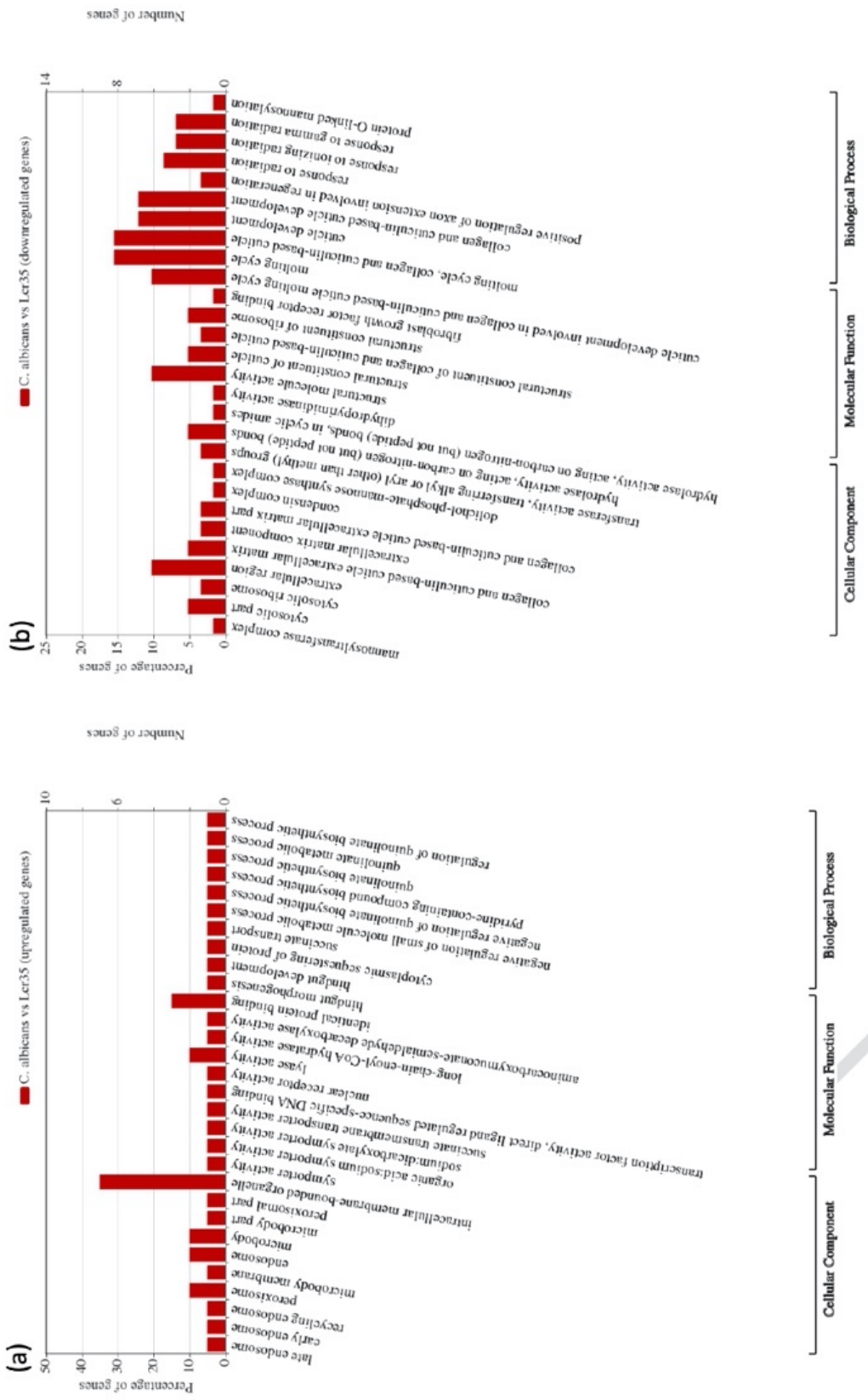


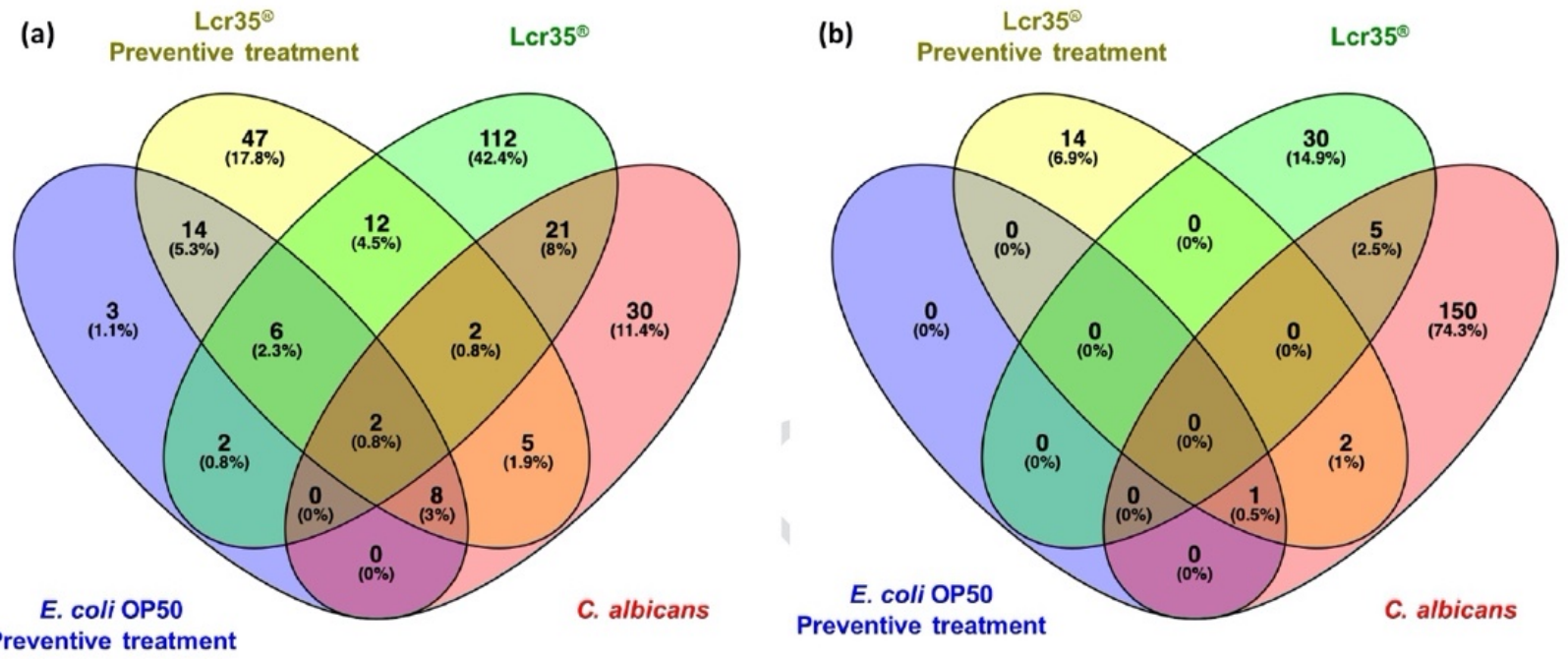
Figure 3: GO analysis of differentially expressed genes in presence of *L. rhamnosus* Lcr35® (control OP50)

Poupet *et al.* 28



666 **Figure 4: GO analysis of differentially expressed genes in presence of *C. albicans* or *L. rhamnosus* Lcr35®**

Poupet *et al.* 29



667

Figure 5: The transcriptional responses to *E. coli* as a preventive treatment and *L. rhamnosus* Lcr35® as a preventive treatment comprise specific and overlapping gene sets. Venn diagrams illustrate the overlap genes significantly upregulated (a) or downregulated (b). Animals were exposed to the bacterial strains for 4 hours and infected by the yeast for 2 hours.

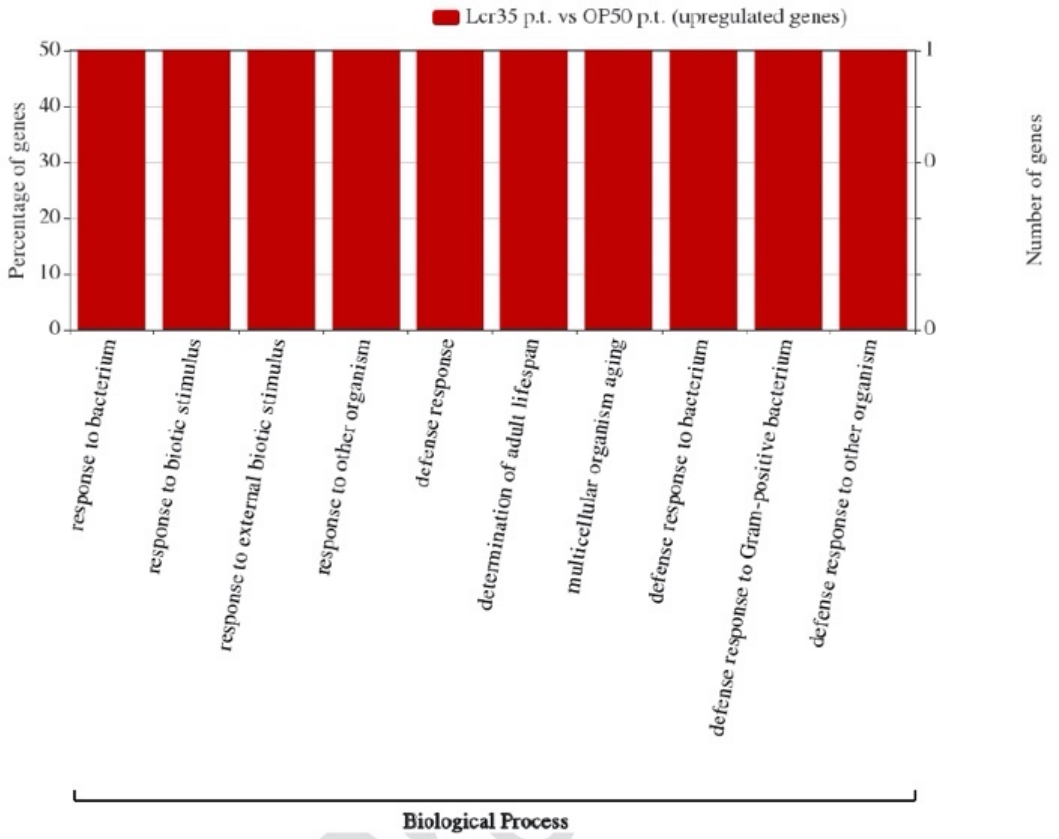


Figure 6: GO analyses of differentially expressed genes after a Lcr35® preventive treatment (p.t.) or a *E. coli* OP50 preventive treatment (p.t.)

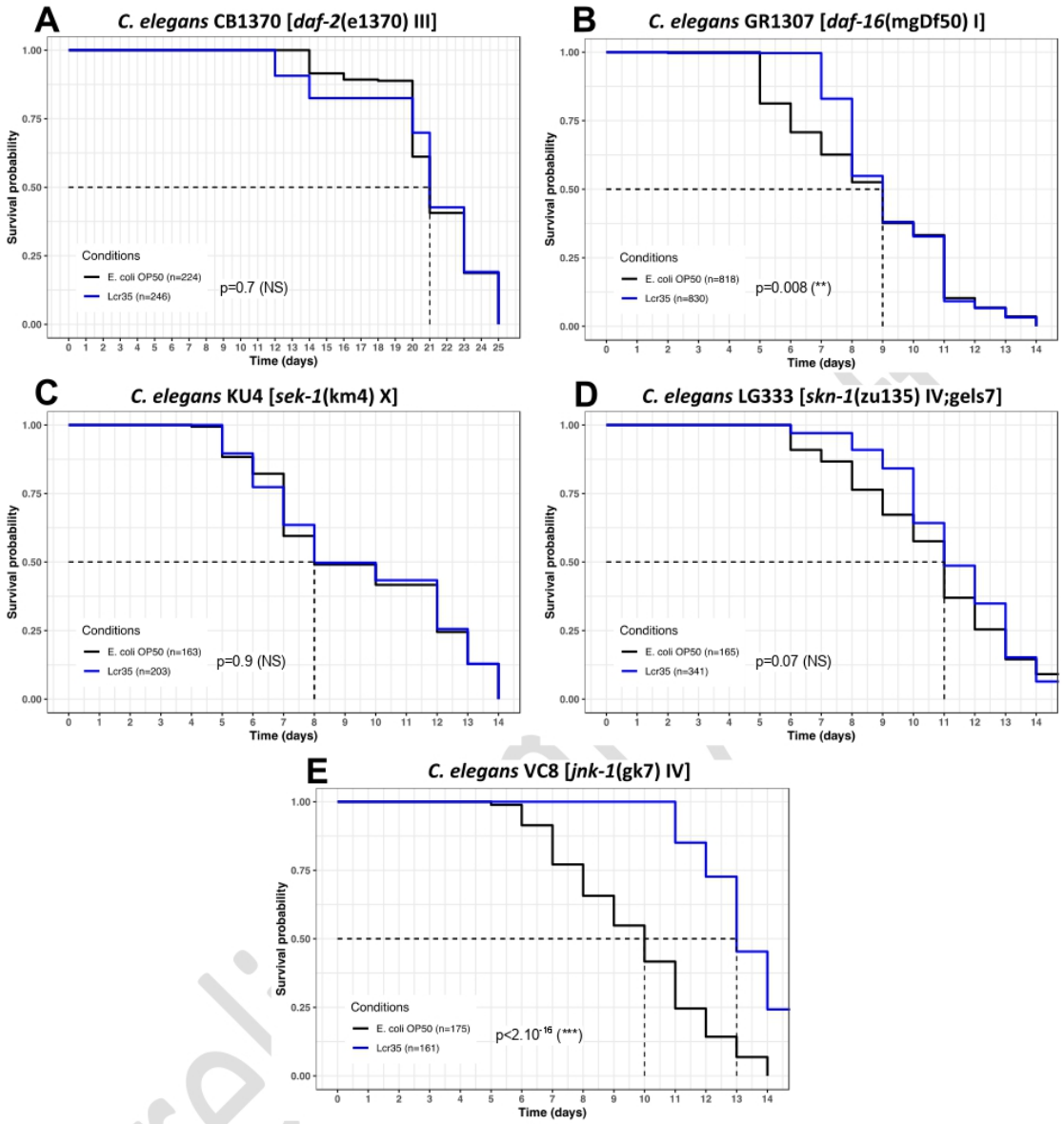


Figure 7: Influence of *L. rhamnosus* Lcr35® on the lifespan of *C. elegans daf-2* (CB1370) (A), *daf-16* (GR1307) (B), *sek-1* (KU4) (C), *skn-1* (LG333) (D) and *jnk-1* (VC8) (E) loss-of-function mutant strains. The mean lifespan, where half of the population was dead, is represented on the abscissa. The asterisks indicate the p-values (log-rank test) with *E. coli* OP50 as a control (NS: not significant; $p < 0.05$: *; $p < 0.01$: **; $p < 0.001$: ***).

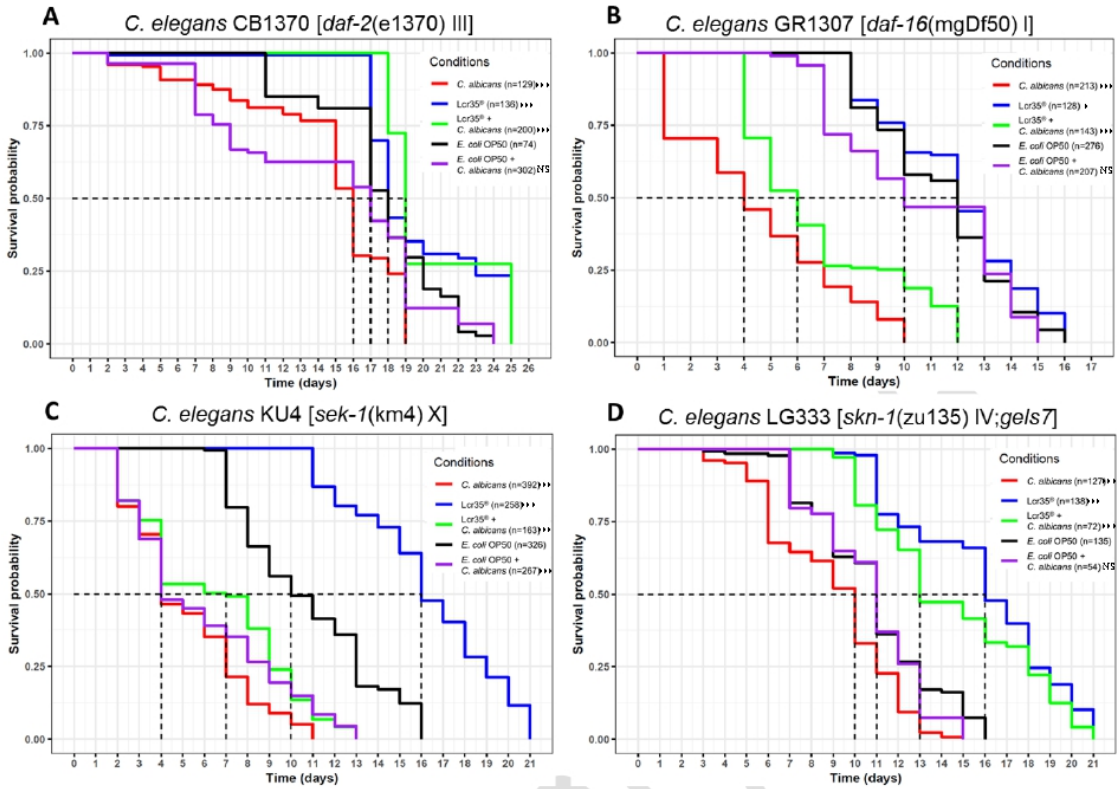
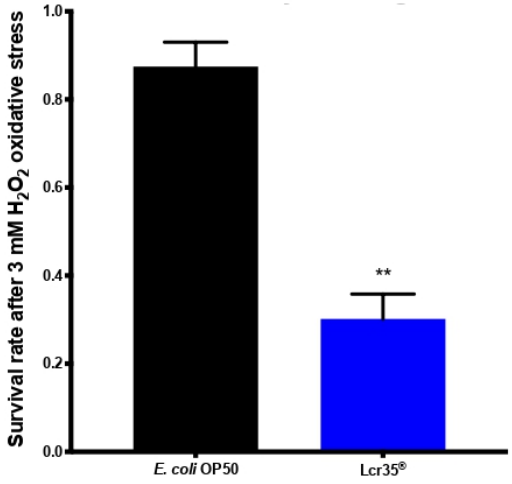


Figure 8: Preventive effects of Lcr35® against *C. albicans* in *C. elegans daf-2* (CB1370) (A), *daf-16* (GR1307) (B), *sek-1* (KU4) (C) and *skn-1* (LG333) (D) loss-of-function mutant strains. The mean lifespan, where half of the population was dead, is represented on the abscissa. The asterisks indicate the p-values (log-rank test) with *E. coli* OP50 as a control (NS: not significant; $p < 0.05$: *; $p < 0.01$: **; $p < 0.001$: ***).

Preliminary



672

Figure 9: Antioxidant assay in *C. elegans*. Survival upon a 3 mM H_2O_2 treatment for 3.5 h of *C. elegans* N2 strain fed for 5 days with *E. coli* OP50 or Lcr35®.

Preliminary draft

En conclusion, nos résultats ont démontré que *L. rhamnosus* Lcr35® nécessitait l'implication de voies de signalisation hautement conservées pour exercer une action pro-longévité et des effets anti *C. albicans* sur le ver *C. elegans*. Nous avons constaté que Lcr35® stimule de manière significative la longévité de *C. elegans* via les voies de signalisation de la kinase DAF-2 / DAF-16 et p38 MAP, mais pas via la voie de signalisation JNK / DAF-16. De plus, les deux premières voies de signalisation, DAF-2 / DAF-16 et p38 MAPK, sont également impliquées dans les effets anti-candidose ce qui est cohérent avec les résultats obtenus lors de nos travaux antérieurs (refs).

De plus, ces travaux ont montré que la réponse transcriptionnelle du nématode était fonction du microorganisme rencontré, à savoir le LBM, le pathogène ou les deux séquentiellement dans le but d'un traitement préventif de l'infection fongique. Globalement, *C. albicans* a tendance à induire une réponse métabolique (catabolisme et anabolisme des petits métabolites) tandis que Lcr35® induit plutôt une réponse structurelle (synthèse des cuticules), ce qui est cohérent avec l'hypothèse d'un renforcement des défenses physiques de l'hôte. Par conséquent, de nouvelles études sont nécessaires pour évaluer précisément l'impact de Lcr35® (seul ou en traitement préventif) sur le protéome et le métabolome de *C. elegans* afin d'obtenir une vision plus globale et intégrative des mécanismes d'action de LBM Lcr35®, allant de l'expression d'un gène d'intérêt jusqu'à la synthèse du métabolite à travers leurs régulations.

Une approche expérimentale similaire et permettant l'étude des propriétés curatives de *L. rhamnosus* Lcr35® par le séquençage des ARN messagers du nématode *C. elegans* a été réaliséeL'analyse des données de séquençage est en cours ce qui explique que les résultats n'ont pas pu être intégrés dans ce manuscrit.

Chapitre 5.

Potentialisation de Lcr35® par le thiosulfate de sodium — études et résultats préliminaires

1. Introduction

La quasi-totalité des études ayant un rapport avec les microorganismes probiotiques l'ont été sur des souches dites natives. Or, il a été démontré que le procédé industriel (*i.e.* fermentation, lyophilisation, formulation) avait un impact non négligeable sur les propriétés d'une souche probiotique, notamment en entraînant des modifications métaboliques et structurales. Ces modifications sont notamment à l'origine de la modulation de propriétés fonctionnelles chez ces souches comme l'adhésion aux cellules épithéliales ou les propriétés inhibitrices de pathogènes (Nivoliez *et al.* 2012 ; Muller *et al.* 2014 ; Nivoliez *et al.* 2015). Parmi les paramètres industriels ayant une influence, l'ajout d'un excipient dans certaines formulations de Lcr35®, le thiosulfate de sodium STS, a un impact sur les propriétés du LBM (Dausset *et al.* soumis). Initialement employés dans les lests de lyophilisation afin de protéger la bactérie lors de l'étape de congélation, il s'avère que le STS permet une potentialisation importante des propriétés antimicrobiennes, notamment anti *Candida*, de Lcr35® (Nivoliez 2013). En effet, en présence de ce sel, il a été montré que la bactérie entraînait *in vitro* une mortalité totale de la levure en 48 heures alors qu'en son absence, une quantité résiduelle (~ 5 $\log_{10}$UFC.mL^{-1}) de *Candida* subsistait. Cette potentialisation de l'activité anti-*Candida* a été démontrée sur trois souches cliniques (*C. albicans, C. glabrata et C. tropicalis*). L'analyse du surnageant de culture a permis de démontrer que l'activité anti-*Candida* est due a un effecteur produit par Lcr35® dans le milieu extracellulaire. Ce potentiel, non lié à la production d'acide lactique et d'H_2O_2, a été caractérisé comme insensible aux traitements protéasiques, lipasiques et thermiques testés. Cependant, le principe actif anti-*Candida* sécrété par le LBM présente un poids moléculaire inférieur à 10 kDa et un point isoélectrique compris entre 4,5 et 6,3. Une surexpression de gènes codants pour des bactériocines-*like* a été observée par RT-qPCR en présence de thiosulfate de sodium ou de la formulation et/ou en présence de *C. albicans* ATCC® 10231™. Ces éléments ont été mis en évidence *in vitro* pendant la thèse de doctorat de Caroline Dausset (Dausset 2015) (Dausset *et al.* soumis).

Ce présent chapitre vise à étudier les capacités inhibitrices de Lcr35®, potentialisées par le STS, vis-à-vis de la croissance et de l'adhésion de *C. albicans* sur des cellules Caco-2. Comme précédemment, deux approches expérimentales ont été menées : une approche préventive (Poupet, Saraoui, *et al.* 2019) et une approche curative (Poupet, Veisseire, *et al.* 2019). Ces deux approches ont été testées sur le modèle *in vivo C. elegans*, correspondant ainsi aux toutes premières études sur un modèle préclinique utilisant une souche probiotique potentialisée.

2. Études *in vitro* sur cellules intestinales Caco-2

Les résultats obtenus en absence et en présence de Lcr35® natif ont déjà été publiés (Poupet, Saraoui, *et al.* 2019 ; Poupet, Veisseire, *et al.* 2019). Ils ne sont représentés ici qu'à titre de comparaison avec la condition Lcr35® potentialisé.

2.1. Approche préventive

Comme ce qui a été décrit dans le Chapitre 2, nous avons testé les propriétés inhibitrices de Lcr35® (+ STS) vis-à-vis de la croissance et de l'adhésion de *C. albicans*, en présence de cellules intestinales Caco-2 (Figure 24). En ce qui concerne la croissance du pathogène, deux profils d'inhibition différents ont été observés après 48 h d'incubation. D'une part, lorsque l'inoculum était fortement concentré (7 $\log_{10}$ UFC.mL^{-1}), nous avons observé une diminution de la population de levures, ce qui est un signe de mort cellulaire. D'autre part, lorsque l'inoculum était moins concentré (2 à 4 $\log_{10}$ UFC.mL^{-1}), nous avons constaté que la levure était capable de se développer, bien que sa croissance semblait s'arrêter entre 5,32 ± 0,36 et 5,51 ± 0,14 $\log_{10}$ UFC.mL^{-1}. En présence de Lcr35® potentialisé, nous avons observé des profils similaires de perte de viabilité chez *C. albicans*. Toutefois, nous notons qu'avec un inoculum faiblement concentré (10^2 UFC.mL^{-1}), Lcr35® induit la plus forte inhibition avec une diminution de 2,48 $\log_{10}$ UFC.mL^{-1} (souche native) et 4,37 $\log_{10}$ UFC.mL^{-1} (souche potentialisée) (Tableau 12). De la même manière, concernant l'inhibition de l'adhésion de la levure (Figure 24), nous avons observé que Lcr35® + STS conduisait à une réduction significative de la quantité de pathogène ayant adhéré aux cellules intestinales (comprise entre 3,5 et 4,5 $\log_{10}$ d'UFC.mL^{-1}). Cependant, en comparant l'inhibition induite par Lcr35® souche native et celle induite par Lcr35® + STS, la différence obtenue est statistiquement non signifivative. Il est également possible que le STS n'ait pas d'influence sur cette propriété.

Tableau 12 : Evolution de la concentration de *C. albicans* en présence de Lcr35® potentialisé sur cellules Caco-2.

Les résultats sont exprimés en $\log_{10}$ d'UFC.mL^{-1} de levures seules ou co-incubées avec Lcr35® (moyenne ± écart type). L'analyse statistique a été réalisée en comparant les co-cultures avec Lcr35® avec celles sans Lcr35®. NB : en raison de valeurs manquantes, l'analyse statistique n'a pas pu être réalisée sur les conditions avec STS.

Concentration de l'inoculum de *C. albicans* (UFC.mL^{-1})	Conditions		Temps d'incubation (h)		
	Lcr35®	STS	0	24	48
10^7	+	-	7.25 ± 0.51	6.39 ± 0.73	6.05 ± 0.25 ****
	+	+	6.93 ± 0.02	6.01 ± 0.35	6.43 ± 0.57
	-	-	6.77 ± 0.10	7.29 ± 0.23	7.78 ± 0.41
10^6	+	-	5.85 ± 0.25	5.47 ± 0.12 *	5.73 ± 0.09 ***
	+	+	5.76 ± 0.24	5.48 ± 0.08	5.45 ± 0.36
	-	-	5.76 ± 0.18	7.42 ± 0.27	7.69 ± 0.20
10^5	+	-	4.77 ± 0.41	5.01 ± 0.12 **	5.49 ± 0.04 ****
	+	+	4.91 ± 0.37	4.67 ± 0.29	4.92 ± 0.32
	-	-	4.60 ± 0.28	7.60 ± 0.69	7.83 ± 0.34
10^4	+	-	3.69 ± 0.21	4.92 ± 0.54	5.51 ± 0.14 *
	+	+	3.92 ± 0.41	4.02 ± 0.38	4.87 ± 0.42
	-	-	3.72 ± 0.13	7.09 ± 0.59	7.48 ± 0.39
10^3	+	-	2.56 ± 0.34	3.59 ± 0.25	5.51 ± 0.16 ****
	+	+	3.22 ± 0.70	3.28 ± 0.60	4.84 ± 0.55
	-	-	2.30 ± 0.17	6.60 ± 0.28	7.93 ± 0.45
10^2	+	-	1.34 ± 0.31	3.18 ± 0.76	5.32 ± 0.36 ***
	+	+	2.31 ± 0.82	2.48 ± 0.21	3,43 ± *no SD*
	-	-	1.34 ± 0,38	6.18 ± 1,01	7.80 ± 0,27

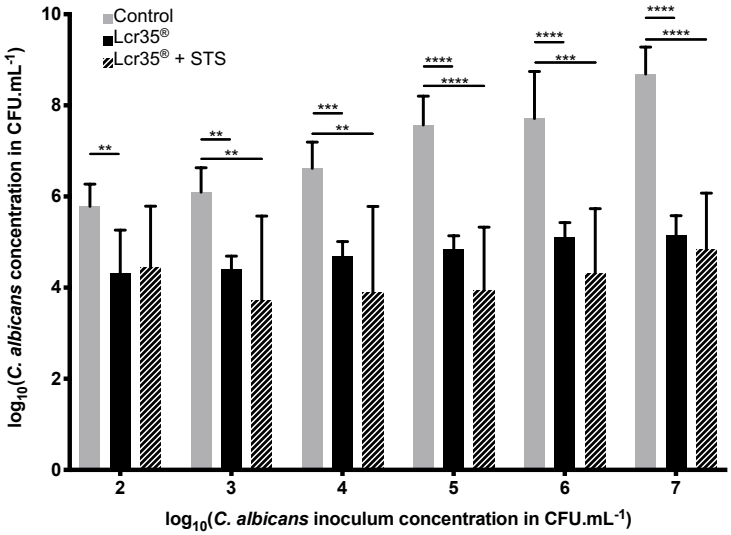


Figure 24 : Inhibition de l'adhésion de *C. albicans* par Lcr35® potentialisé en situation préventive

2.2. Approche curative

Sur une monocouche de cellules Caco-2, la population de levure a atteint 8,31 ± 0,38 log_{10} UFC.mL^{-1} après 48 h d'incubation. Avec un traitement curatif Lcr35®, nous avons observé une croissance similaire de la levure qui a atteint 7,96 ± 0,18 log_{10} UFC.mL^{-1} (Figure 25). Ainsi, aucune inhibition significative (après 24 h, p = 0,902; après 48 h, p = 0,603) de la croissance de la levure n'a été constatée en présence du LBM natif. En revanche, en présence de Lcr35® + STS, nous observons une inhibition significative du pathogène qui atteint une population de 5,77 log_{10} UFC.mL^{-1} (p = 0,001 6).

Après 48 h d'incubation, le biofilm de *C. albicans* contenait 8,06 ± 0,42 log_{10} UFC.mL^{-1} de levures (Figure 26). Une concentration similaire a été mesurée après un traitement curatif au Lcr35® avec 8,10 ± 0,19 log_{10} UFC.mL^{-1} de levures. Ces résultats suggèrent que Lcr35® n'inhibe pas (p = 0,959) la formation d'un biofilm par *C. albicans in vitro*. Cependant, comme pour la croissance, nous observons une inhibition significative de l'adhésion de la levure en présence de Lcr35® + STS puisqu'on ne retrouve qu'une adhésion de 4,82 log_{10} UFC.mL^{-1} de levures (p = 0,004 1).

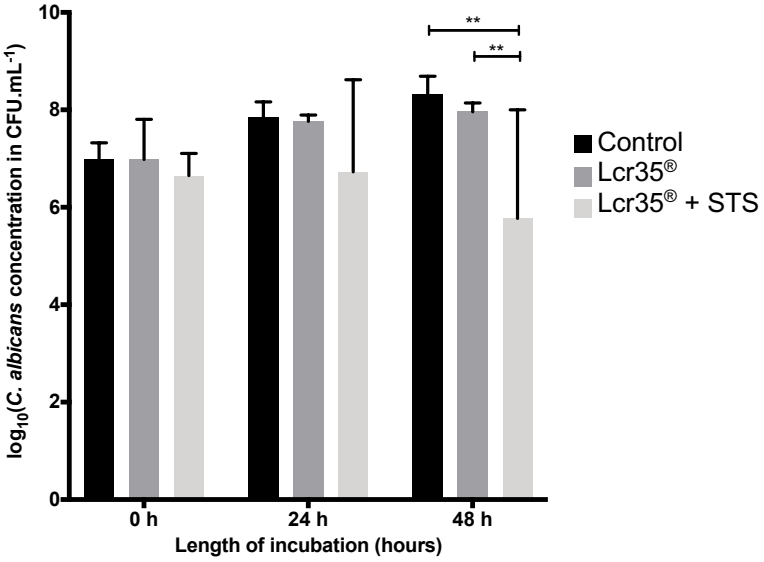


Figure 25 : Inhibition de la croissance de *C. albicans* par Lcr35® potentialisé en situation curative

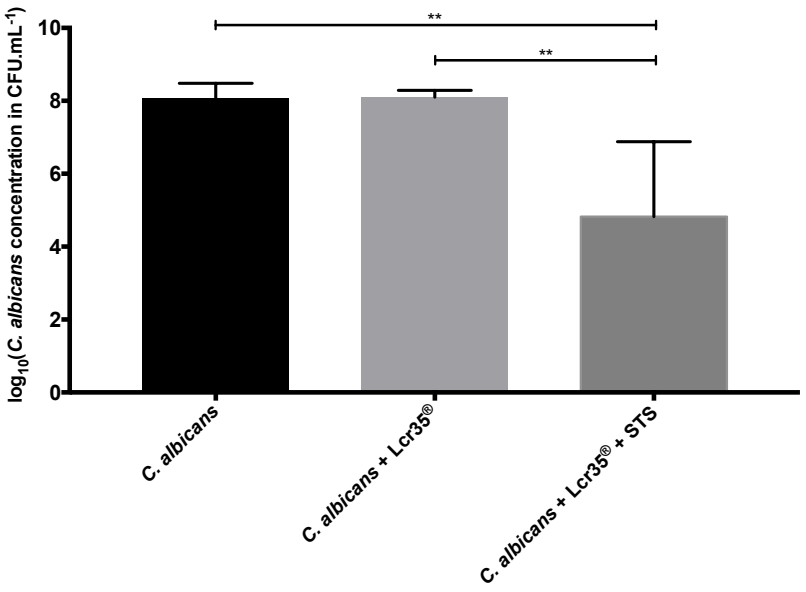


Figure 26 : Inhibition de l'adhésion de *C. albicans* par Lcr35® + STS en situation curative

3. Etudes *in vivo* chez *C. elegans*

Il n'existe actuellement aucune donnée publiée dans la littérature scientifique portant sur la potentialisation de propriétés probiotiques d'un microorganisme et sur sa caractérisation dans un modèle *in vivo*. Il est donc important de souligner le caractère novateur des résultats présentés dans ce paragraphe.

3.1. Impact de la potentialisation de Lcr35® sur la longévité du ver

La présence de STS dans le millieu permettant la croissance des bactéries (LB pour *E. coli* OP50, MRS pour Lcr35®) peut potentiellement entraîner des modifications métaboliques chez ces bactéries. Ces modifications peuvent par ailleurs avoir un impact, positif ou négatif, chez *C. elegans* lorsque ces bactéries sont utilisées comme nourriture. Nos résultats, présentés en Figure 27, montrent en effet une augmentation significative (p = 5,31.10^{-5}) de la survie médiane des nématodes, lorsqu'ils sont en présence d'*E. coli* OP50 cultivé avec du STS. La longévité totale n'est quant à elle pas impactée. En revanche, Lcr35® + STS n'a pas d'impact sur la longévité ni sur la survie médiane du nématode, en comparaison des vers nourris avec Lcr35® natif (p = 0,174). Ces résultats montrent l'absence de toxicité du STS utilisé à 1 g.L^{-1} pour le nématode. En revanche, l'effet potentialisant du STS n'est pas observé en étudiant ces critères et dans ces conditions expérimentales.

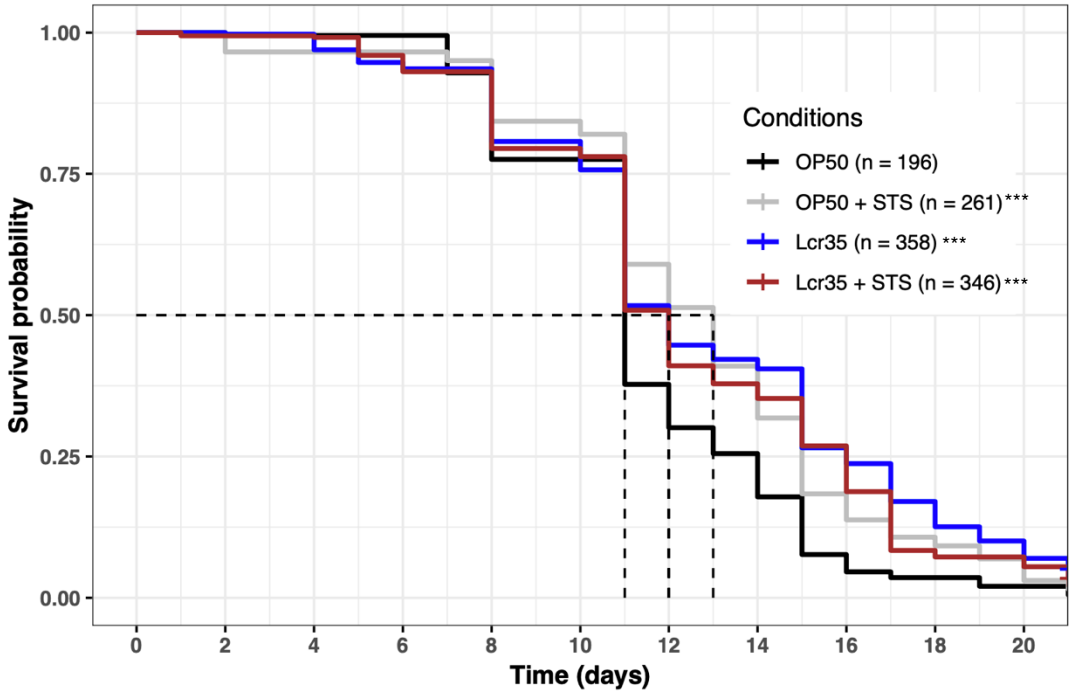


Figure 27 : Effet du thiosulfate sur la longévité de *C. elegans*

3.2. Effet de la potentialisation de Lcr35® par le STS sur l'activité biologique du facteur de transcription DAF-16 : : GFP

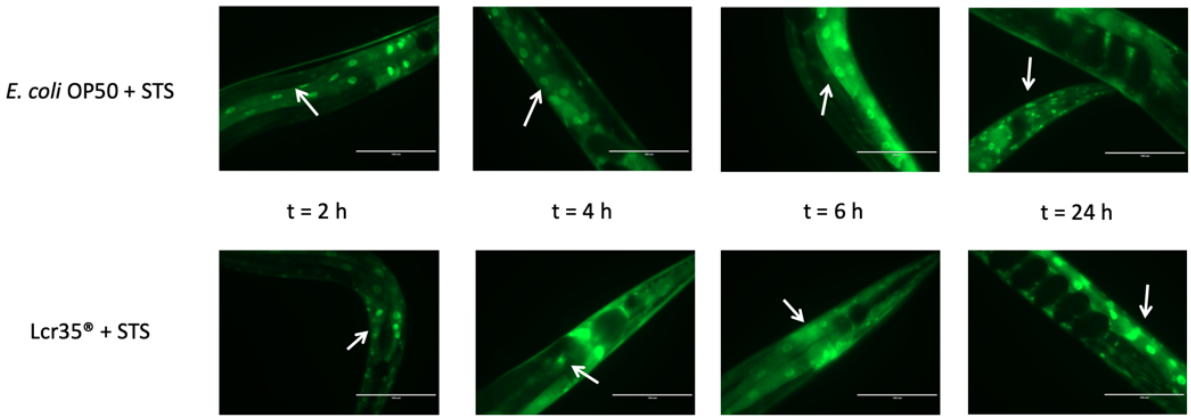


Figure 28 : Localisation cellulaire du facteur de transcription DAF-16 : : GFP en présence de Lcr35® potentialisé

L'accumulation de la protéine est indiquée par les flèches blanches.

Contrairement à ce que nous avions observé précédemment (Poupet, Saraoui, *et al.* 2019), la présence du thiosulfate de sodium induit systématiquement une translocation vers les noyaux cellulaires du facteur de transcription DAF-16, aussi bien avec *E. coli* OP50 qu'avec

Lcr35® (Figure 28). Les résultats obtenus en présence d'*E. coli* OP50 peuvent expliquer l'augmentation de la longévité mise en évidence (Figure 27), DAF-16 permettant l'expression de gènes impliqués dans la longévité. En revanche, la souche native Lcr35® induit la translocation du facteur de transcription, mais il semblerait que la potentialisation par le STS n'a pas d'effet cumulatif en ce qui concerne l'activité prolongévité de Lcr35®.

3.3. Effet de la potentialisation sur la survie face à l'infection

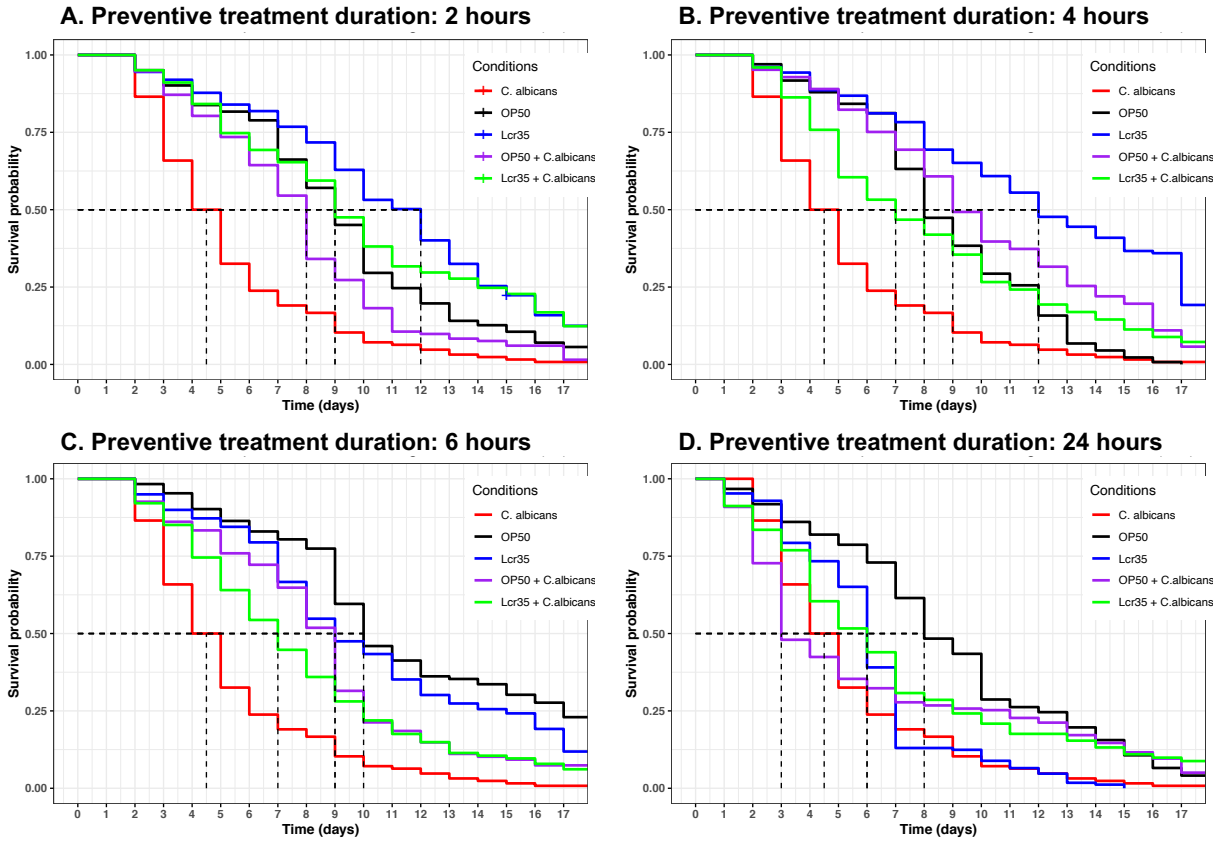


Figure 29 : Courbes de survie de *C. elegans* infecté par *C. albicans* et traité préventivement par Lcr35® +STS

À l'exception des conditions avec *C. albicans* (seul), toutes les autres conditions contiennent soit *E. coli* OP50 + STS, soit Lcr35® + STS.

Lorsque *C. elegans* a été infecté séquentiellement par *C. albicans* pendant 2 h avant d'être exposé pendant 2 h à Lcr35® + STS, la survie des nématodes est augmentée de manière significative ; la durée de vie moyenne est passée de 4,5 à 9 jours (augmentation de 125 %) par rapport à celle observée lors d'une infection à *C. albicans* seule ($p < 2.10^{-16}$) (Figure 29 A). Dans les deux cas, la survie médiane des vers en présence de Lcr35® seul + STS est plus grande. En revanche, après un temps de traitement supérieur à 4 heures (Figure

29 B, C et D), les vers ayant reçu un traitement préventif avec Lcr35® présentent une médiane de survie réduite par rapport à la condition contrôle *E. coli* OP50 (respectivement $p = 0,7$, $p = 6.10^{-12}$, $p = 0,07$), mais tout en restant supérieure à la condition *C. albicans* (respectivement 7, 7 et 6 jours). Une diminution de la survie est également observée avec les vers n'ayant été en présence que de Lcr35® pour les temps de traitements de 6 et 24 heures (survie médiane respectivement égale à 9 et 6 jours) ($p = 8.10^{-4}$ et $p = 3.10^{-12}$). Ces résultats suggèrent que d'une part, Lcr35® potentialisé ne permet plus de prévenir l'infection fongique chez le nématode (à l'exception du temps de traitement 2 heures) et que d'autres part, dans ces conditions expérimentales, le LBM potentialisé n'exerce pas d'effet bénéfique. Ces résultats sont contradictoires avec ce qui a été obtenu précédemment (Poupet, Saraoui, *et al.* 2019) et aucune littérature scientifique ne permet d'expliquer un tel phénomène. Cependant, nous ne nous trouvons pas dans les conditions optimales de croissance de Lcr35®. Nous pouvons tout à fait imaginer qu'à 20 °C (température de culture du ver) et en présence de STS, Lcr35® subisse un stress physico-chimique pouvant altérer plus ou moins profondément sa physiologie et par conséquent, son aptitude à être potentialisé par le STS et/ou à protéger l'hôte *C. elegans* de l'infection fongique.

4. Conclusion

Pour conclure ce dernier chapitre, les résultats obtenus lors de ces études préliminaires ont montré que l'efficacité de la potentialisation de Lcr35® par le STS, dans nos conditions expérimentales, était en deçà ce qui avait été démontré lors de travaux précédents *in vitro* (Nivoliez *et al.* 2012; Nivoliez 2013). C'est notamment le cas dans nos expériences sur les cellules Caco-2 en condition préventive de même qu'avec le modèle *C. elegans*. Dans le premier cas, des différences méthodologiques entre nos approches et celles des précédents travaux (milieux de culture, cultures séquentielles) peuvent être à l'origine de cette baisse d'efficacité. Dans le second cas, il convient de rappeler qu'il est impossible de travailler avec *C. elegans* à la température de 37 °C. Il doit impérativement être maintenu à température ambiante (20 à 25 °C). Or, il est probable que la potentialisation de Lcr35® par le STS soit inefficace à cette température. Aussi, à cette température, nous ne connaissons pas l'état physiologique de Lcr35® qui subit peut-être un stress alternant ses capacités à bénéficier de l'effet potentialisateur du STS pour à combattre le pathogène. Aussi, nous pouvons émettre l'hypothèse que le modèle *C. elegans* n'est peut-être pas adapté dans ce cas précis.

Néanmoins, il serait judicieux d'étudier la modulation du transcriptome de *C. elegans*, par des techniques de NGS, en présence de la souche Lcr35® + STS. Cela permettrait de

comprendre plus précisément pourquoi la potentialisation par le thiosulfate est peu efficace en condition *in vivo* (*C. elegans*) alors qu'elle l'est particulièrement lors de co-culture *in vitro*. Cependant, ces résultats *in vivo* contradictoires avec les conclusions obtenues *in vitro* montrent la complexité d'étudier les mécanismes d'action des probiotiques et suggèrent l'intérêt de combiner différentes approches *in vitro* et *in vivo*. Par ailleurs, le modèle *C. elegans* nous a tout de même permis de mettre en lumière l'impact très important des conditions expérimentales sur les propriétés technologiques et fonctionnelles d'une souche. Cet aspect constitue dès lors un levier scientifique qu'il est nécessaire de prendre en considération lors de la fabrication industrielle d'un LBP afin de s'assurer d'utilisation optimale du produit.

Discussion, conclusion et perspectives

Le corps humain abrite une grande diversité de communautés microbiennes composées de plus de 10^{12} bactéries (Wang *et al.* 2017). Ces communautés, qui présentent des variabilités spatio-temporelles et inter-individus, constituent le microbiote commensal de l'Homme. Avec l'avènement des techniques de biologie modernes à haut débit, les scientifiques ont mis en évidence que les microbiotes jouaient une multitude de rôles ayant pour conséquence des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte (Young 2017). En effet, une altération du microbiote ou dysbiose, peut conduire à l'apparition de pathologies localisées ou systémiques. C'est par exemple le cas des maladies inflammatoires intestinales, de certains cancers colorectaux ou de syndromes métaboliques (Sartor 2008 ; P. D. Scanlan *et al.* 2008 ; Verhulst *et al.* 2008). Une dysbiose peut également être la cause ou la conséquence d'une maladie infectieuse, comme cela a pu être décrit au niveau des tractus digestif et urogénital. Dans ces cas-là, les infections sont majoritairement traitées par des antibiotiques ou des antifongiques afin de détruire l'agent pathogène. Cependant, deux problèmes se posent : (1) ces traitements conventionnels ne permettent pas de rééquilibrer une flore altérée ce qui laisse le champ libre pour l'implantation d'un nouveau pathogène ou d'une récidive ; (2) la résistance grandissante des pathogènes aux molécules antimicrobiennes limitent de ce fait leur efficacité. Des approches alternatives doivent donc être mises en place qui auraient pour vocation d'éliminer le pathogène sans altérer le microbiote. Parmi ces alternatives, l'utilisation des LBM / LBP a fait ses preuves comme c'est le cas de la souche *L. rhamnosus* Lcr35®. Au-delà des propriétés biologiques intrinsèques de la souche, celles-ci peuvent être potentialisées par un procédé de production industrielle incluant la formulation. Lors de précédents travaux, Nivoliez *et al.* ont démontré les capacités potentialisatrices du STS sur les propriétés phénotypiques et anti *C. albicans* de Lcr35® (Nivoliez *et al.* 2012 ; Nivoliez 2013).

Le principal objectif de ce travail de thèse était de caractériser *in vivo* les propriétés antimicrobiennes, notamment anti *C. albicans*, de la souche *L. rhamnosus* Lcr35®. Pour cela, des approches de traitements préventifs et curatifs de la candidose intestinale ont été menées chez un modèle animal innovant, le nématode *C. elegans*. En parallèle, les propriétés inhibitrices de Lcr35® vis-à-vis du pathogène ont également été évaluées *in vitro* sur le modèle cellulaire Caco-2.

Il convenait dans un premier temps de s'assurer de l'innocuité de la souche probiotique pour son hôte. Nous avons confirmé cet aspect par la réalisation de tests de longévité du nématode avec pour seule source de nourriture Lcr35®. Dans cette condition, celui-ci a une durée de vie totale identique au contrôle, mais présente une survie médiane augmentée. De plus, le suivi de la croissance de l'animal adulte dans les mêmes conditions a montré l'absence de différence significative par rapport au groupe contrôle. Ces résultats suggèrent que Lcr35®

n'est pas une source nutritive carencée pour le ver et que le mécanisme expliquant la longévité observée n'est pas la conséquence d'une restriction calorique contrairement à ce qui a été décrit avec d'autres souches de lactobacilles (Guantario *et al.* 2018 ; Zanni *et al.* 2015). Des résultats similaires ont été obtenus avec Lcr35® + STS.

Nous avons ensuite démontré les capacités anti *C. albicans* de Lcr35® chez l'hôte grâce à la réalisation de cultures séquentielles. Lors d'une approche préventive, à savoir lorsque le ver est initialement nourri avec Lcr35® puis infecté avec *C. albicans*, nous avons mis en évidence que le ver résiste totalement à l'infection dès lors que le temps d'incubation avec le LBM est court (2 et 4 heures). Ce type de résultats est en accord avec l'unique étude publiée, s'intéressant aux propriétés antifongiques de *L. paracasei* (de Barros *et al.* 2018). Cependant, dans cette étude, la protection de l'hôte n'est pas totale et se situe plutôt à mi-chemin entre les conditions où l'hôte est infecté et celle où il est uniquement en présence des lactobacilles. En revanche, dans nos études, nous avons remarqué une diminution de l'efficacité du LBM dès lors que les vers sont en sa présence plus de 6 heures. Ce type de résultat était inattendu aucune étude similaire n'a été publiée dans la litérature scientifique. Une hypothèse est que, dans nos conditions expérimentales, Lcr35® peut présenter une certaine pathogénicité ou sécréter des molécules toxiques pouvant entraver (partiellement) la survie de l'hôte. De même, ces résultats suggèrent l'existance d'un effet dose ou en lien avec la durée du traitement, en faveur d'une faible quantité de LBM (2 heures). Des résultats tout à fait similaires ont été obtenus lors de tests curatifs, et également reproduits vis-à-vis d'un isolat clinique de *C. albicans* (ces derniers résultats n'étant que partiels (nombre insuffisant de réplicats), ils ne sont pas présentés dans ce manuscrit). Une approche identique a été menée avec Lcr35® potentialisé par le STS, mais les résultats ont montré une protection moindre de l'hôte face à l'infection. Dans tous les cas, malgré une protection de l'hôte face à l'infection, nous avons systématiquement détecté la présence de la levure dans le tractus digestif de *C. elegans* à l'aide de marquage fluorescent. Or, ces colorants n'étant pas des marqueurs de viabilité, il n'est pas possible de connaître l'état physiologique du pathogène dans l'hôte. Ces résultats suggèrent tout de même deux hypothèses : il est possible que Lcr35® inhibe la virulence de la levure la rendant inoffensive pour son hôte ou bien provoque une tolérance immunitaire chez l'hôte tel que cela a été suggéré lors d'une précédente étude (Ikeda *et al.* 2007).

Lors de nos études mécanistiques, nous avons démontré, grâce à l'utilisation de la RT-PCR quantitative et de souches mutantes, l'implication de deux grandes voies de signalisation hautement conservées chez *C. elegans* : les voies de l'insuline DAF-2/DAF-16 et p38 MAP kinase. Ces deux voies sont nécessaires, à des degrés distincts, aux propriétés de

prolongévité et antifongiques de Lcr35®. Concernant la voie de l'insuline, nous avons notamment mis en évidence la mobilisation, aussi bien par Lcr35® que *C. albicans*, du facteur de transcription DAF-16 et par conséquent, de la transcription de gènes en aval de la voie (longévité et résistance à des stress biotiques et abiotiques). Aussi, l'analyse de la modulation du transcriptome de *C. elegans* en situation préventive a montré des réponses transcriptionnelles différentes selon que le ver a été en présence de Lcr35®, de *C. albicans* ou bien des deux successivement. Dans le premier cas, nous avons montré qu'il y avait principalement une réponse dite structurelle avec la mise en œuvre de gènes impliqués dans la synthèse de la cuticule. Dans le second cas, il s'agit plutôt d'une réponse métabolique, impliquant notamment le métabolisme énergétique et la synthèse de petits métabolites. Enfin dans le dernier cas, nous avons noté une réponse liée à des processus permettant la longévité de l'hôte et la réponse à des stress biotiques.

Afin de compléter les données obtenues, l'analyse du transcriptome de *C. elegans* infecté par *C. albicans* et traité curativement par Lcr35® est en cours : le séquençage des ARN messagers a été réalisé ; le traitement bioinformatique des données et l'interprétation ne sont pas terminés. Aussi, nous envisageons d'effectuer des tests de traitement curatif chez des nématodes mutants afin de comparer si les gènes nécessaires aux propriétés préventives de Lcr35® le sont aussi dans ce cas. Il est néanmoins évident que des approches phénotypiques et transcriptomiques sont insuffisantes pour comprendre de manière précise les mécanismes d'actions de *L. rhamnosus* Lcr35®. Une approche intégrée utilisant la protéomique et/ou la métabolomique s'avère inévitable. À l'aide de la spectrométrie de masse ou de la spectrométrie RMN, il serait possible d'identifier les molécules antifongiques (antipathogènes d'une manière générale) sécrétées par Lcr35®, les métabolites de défense synthétisés par la levure, mais également ceux produits par l'hôte en réponse aux deux microorganismes. L'approche métabolomique permettrait dès lors de mieux comprendre comment Lcr35® permet à l'hôte de résister à l'infection fongique. Une telle étude métabolomique devrait être réalisée aussi bien avec *L. rhamnosus* Lcr35® natif que Lcr35® + STS, en condition *in vitro* (culture binaire probiotique / pathogène) et *in vivo* (culture ternaire hôte / probiotique / pathogène) ceci dans le but (i) d'étudier l'impact de la potentialisation du STS sur le métabolisme de la bactérie et (ii) pour caractériser l'impact des conditions de culture sur le métabolome de Lcr35® à savoir 20 °C (*in vivo*) versus 37 °C (*in vitro*).

Au cours de notre étude, nous nous sommes focalisés uniquement sur le pathogène *C. albicans*. Cependant, une collection de pathogènes humains a été étudiée à l'aide du modèle *C. elegans* (Annexe 1, tableau 1). Des opportunités futures pourraient être d'élargir le

panel d'agents pathogènes étudiés, notamment les isolats cliniques. L'étude de Hwang *et al.* a démontré que *C. elegans* est un modèle efficace pour examiner et comparer le pouvoir pathogène et la variation de virulence des souches de STEC (24 souches testées) à ceux des souches de *E. coli* OP50 (Hwang *et al.* 2018). White *et al.* ont démontré l'intérêt d'une approche par *C. elegans* pour l'identification de nouveaux gènes impliqués dans la lutte contre l'infection émergente du pathogène bactérien nosocomial *Stenotrophomonas maltophilia* (White and Herman 2018). Le travail de Wan *et al.* fournit de nouvelles informations sur la pathogenèse de *Bacillus thuringiensis* et souligne l'importance de la destruction des jonctions épithéliales de l'hôte pour une infection réussie (Wan *et al.* 2019). Un mécanisme similaire pourrait être utilisé pour d'autres interactions agent pathogène-hôte puisque les jonctions épithéliales sont des structures conservées chez les insectes jusqu'aux mammifères. Des efforts doivent être faits pour élucider davantage les mécanismes conservés au cours de l'évolution de la pathogenèse bactérienne et fongique, ainsi que des interactions hôte-microbes. Ce modèle de ver offre l'opportunité d'explorer les interactions trans-règnes potentielles, de définir la fonction du microbiote commensal et des interactions hôte-microbiote-pathogènes. Le prochain défi consiste à utiliser *C. elegans* pour étudier les multi-infections afin de définir les relations et les influences des microbes les uns sur les autres.

Des développements futurs du modèle *C. elegans* sont basés sur l'étude de la longévité. Le lien entre DAF-2 / Insuline IGF-1 et la durée de vie de *C. elegans* a été rapporté par Kenyon *et al.* (1993). D'autres études sur cette voie fourniront un nouveau paradigme qui aidera à comprendre le vieillissement en bonne santé d'organismes plus complexes tels que l'Homme (Ewald *et al.* 2018). De nombreux travaux de recherche sont axés sur les bactéries lactiques et leurs activités anti-pathogènes, leur capacité à prolonger la vie de *C. elegans* et à gérer le stress oxydatif et l'inflammation, mais certains domaines de recherche n'ont pas encore été exploités. L'obésité, le diabète, la maladie de Parkinson et même le cancer peuvent être des axes de recherche émergents. Par exemple, *C. elegans* peut aider à étudier les mécanismes moléculaires du cancer (Qi *et al.* 2017) et pourrait être utilisé comme outil de diagnostic précoce de cette maladie (Mizuguchi and Hirotsu 2018).

C. elegans possède plusieurs des caractéristiques d'un modèle efficace pour la caractérisation d'un LBM. C'est un outil puissant déjà utilisé pour évaluer l'impact des microorganismes sur la longévité et l'immunité de *C. elegans* et pour étudier leur effet anti-pathogène. C'est un outil simple d'utilisation qui permet d'étudier le lien entre l'immunité innée et le vieillissement, ainsi qu'entre le microbiote intestinal et le vieillissement. Il offre la possibilité de définir les interactions hôte-microbes et microbes-microbes. Les futurs objectifs de recherche de *C. elegans* sont de caractériser le mode d'action des souches d'intérêt afin

de mieux comprendre leurs effets sur l'Homme et de développer des produits biothérapeutiques vivants encore meilleurs pour traiter un plus large éventail d'affections liées à la dysbiose humaine. Le nombre de cellules est de toute façon limité (20 cellules intestinales sur 959 cellules pour un ver entier), ce qui interroge la pertinence des phénotypes observés et leur extrapolation à l'homme composé de nombreux tissus différents et complexes. Le modèle *C. elegans* peut aussi être utilisé pour évaluer l'innocuité des microorganismes, en évaluant sa durée de vie (Chen *et al.* 2018). Le défi de la validation de *C. elegans* en tant que modèle pertinent pour étudier l'innocuité des souches consiste aussi à évaluer comment établir un parallèle avec l'Homme. *C. elegans* offre des perspectives en raison de l'homologie existante entre les cellules intestinales du ver et les cellules intestinales humaines en termes de génétique et de physiologie. Une optimisation intéressante de ce modèle consisterait à en faire un outil efficace pour étudier des interactions plus complexes hôte-microorganismes (hôte-microbiote, hôte-holobionte). Le modèle de *C. elegans* permet une analyse transcriptomique, protéomique et des réseaux, offrant des perspectives de connaissances mécanistiques prometteuses (Cassidy *et al.* 2018 ; White and Herman 2018 ; Sharika *et al.* 2018). De plus, une collection de mutants de *C. elegans* est déjà disponible pour la communauté scientifique permettant la réalisation d'études mécanistiques approfondies.

Bien qu'il s'agisse d'une des tehniques les plus courantes lors de recherche avec *C. elegans*, l'évaluation de la survie d'une population est un processus long et fastidieux. Une nouvelle procédure d'estimation doit être mise au point afin d'élargir les applications au criblage de collections de microorganismes (Scanlan *et al.* 2018 ; Josende *et al.* 2019). Il est nécessaire de progresser vers une automatisation plus technique afin de permettre une collecte de données plus rapide et fiable à partir d'une population de vers. Aussi, le renforcement de l'analyse des données par des approches biostatistiques pourrait permettre une interprétation plus fine des résultats issus de tests de longévité et de survie. Dans les années à venir, ce modèle *in vivo* pourrait être largement utilisé pour mieux caractériser les microorganismes à l'aide d'approches omiques associées au développement de l'automatisation des outils d'analyse pour le comptage ou le tri de vers). Les sociétés de biotechnologie commencent déjà à développer des outils à haut débit utilisant le nématode. La microfluidique représente de nouvelles perspectives pour manipuler *C. elegans* à haut débit et réaliser des études automatisées à l'aide de méthodes d'imagerie à haute résolution (Mondal *et al.* 2016).Ce modèle pourra alors être utilisé pour étudier un plus grand panel de microorganismes pathogènes et LBM dans le but de développer de nouveaux LBP ou d'examiner plus en détail les mécanismes relatifs aux maladies humaines.

Ainsi, l'ensemble des résultats obtenus durant ce travail de thèse ont permis de démontrer que le nématode *C. elegans* constitue un modèle pertinant pour des études précliniques cherchant à caractériser les mécanismes d'actions de LBM (ou de probiotiques de manière générale) au niveau moléculaire. Ce modèle se positionne en amont des expériences sur des animaux de laboratoire incontournables que sont les rats et les souris. Son utilisation comme première étape de criblage/caractérisation devrait permettre de réduire le nombre d'expérimentations sur mammifères. En effet, *C. elegans* permet la réalisation de tests sur un grand nombre d'individus en même temps et sur une durée limitée pour un coût financier et matériel limité. Aussi, il permet aisément la réalisation d'études phénotypiques et mécanistiques à l'aide de microorganismes vivants, morts, mais également de leurs métabolites sécrétés par exemple dans leurs surnageants de culture. De ce fait, *C. elegans* ouvre de nouvelles perspectives dans le développement d'essais pour étudier la cytotoxicité de nouvelles molécules bioactives ou la pathogénicité microbienne et les mécanismes de défense de l'hôte et propose de nouvelles stratégies pour comprendre leur mode d'action (produit chimique spécifique, facteur de virulence). *C. elegans* permet de suivre un microorganisme chez un animal entier à l'aide d'approches transcriptomiques et protéomiques ainsi que métabolomiques et physiologiques (Yang *et al.* 2015, 2016). Dans les années à venir, nous pouvons envisager qu'il soit ajouté aux plateformes de criblage pour le développement de nouveaux LBPs.

Références bibliographiques

-A-

Aballay, A., and F. M. Ausubel. 2001. "Programmed Cell Death Mediated by Ced-3 and Ced-4 Protects *Caenorhabditis Elegans* from *Salmonella* Typhimurium-Mediated Killing." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (5): 2735–39. https://doi.org/10.1073/pnas.041613098.

Aballay, Alejandro, Eliana Drenkard, Layla R. Hilbun, and Frederick M. Ausubel. 2003. "*Caenorhabditis Elegans* Innate Immune Response Triggered by *Salmonella Enterica* Requires Intact LPS and Is Mediated by a MAPK Signaling Pathway." *Current Biology* 13 (1): 47–52. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)01396-9.

Aidy, Sahar El, and Bartholomeus van den Bogert. 2015. "The Small Intestine Microbiota, Nutritional Modulation and Relevance for Health." *Current Opinion in Biotechnology* 32 (April). Elsevier Current Trends: 14–20. https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2014.09.005.

Al-Assal, Karina, Ana Cristina Martinez, Raquel Susana Torrinhas, Camila Cardinelli, and Dan Waitzberg. 2018. "Gut Microbiota and Obesity." *Clinical Nutrition Experimental* 20 (August). Elsevier : 60–64. https://doi.org/10.1016/J.YCLNEX.2018.03.001.

Alberts, Bruce, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science.

Albrecht, Antje, Angelika Felk, Iva Pichova, Julian R Naglik, Martin Schaller, Piet de Groot, Donna Maccallum, et al. 2006. "Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Proteases of *Candida Albicans* Target Proteins Necessary for Both Cellular Processes and Host-Pathogen Interactions." *The Journal of Biological Chemistry* 281 (2). American Society for Biochemistry and Molecular Biology: 688–94. https://doi.org/10.1074/jbc.M509297200.

Alexa, A, and J Rahnenfuhrer. 2019. "TopGO: Enrichment Analysis for Gene Ontology."

Alper, Scott, Sandra J McBride, Brad Lackford, Jonathan H Freedman, and David A Schwartz. 2007. "Specificity and Complexity of the *Caenorhabditis Elegans* Innate Immune Response." *Molecular and Cellular Biology* 27 (15): 5544–53. https://doi.org/10.1128/MCB.02070-06.

Altun, Z.F., and D.H. Hall. 2009. "Introduction." WormAtlas. 2009. https://doi.org/10.3808/wormatlas.1.1.

Anahtar, Melis N., Elizabeth H. Byrne, Kathleen E. Doherty, Brittany A. Bowman, Hidemi S. Yamamoto, Magali Soumillon, Nikita Padavattan, et al. 2015. "Cervicovaginal Bacteria Are a Major Modulator of Host Inflammatory Responses in the Female Genital Tract." *Immunity* 42 (5): 965–76. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.04.019.

Andersson, Anders F., Mathilda Lindberg, Hedvig Jakobsson, Fredrik Bäckhed, Pål Nyrén, and Lars Engstrand. 2008. "Comparative Analysis of Human Gut Microbiota by Barcoded Pyrosequencing." *PLoS ONE* 3 (7): e2836. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002836.

ANOFEL. 2014. "Candidoses." https://doi.org/10.1016/s2211-9698(06)76,246-x.

Apidianakis, Y., and L. G. Rahme. 2011. "*Drosophila Melanogaster* as a Model for Human Intestinal Infection and Pathology." *Disease Models & Mechanisms* 4 (1): 21–30. https://doi.org/10.1242/dmm.003970.

Arqués, Juan L., Eva Rodríguez, Susana Langa, José María Landete, and Margarita Medina. 2015. "Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria in Dairy Products and Gut: Effect on Pathogens." *BioMed Research International* 2015: 1–9. https://doi.org/10.1155/2015/584183.

Arrieta, Marie-Claire, Jens Walter, and B Brett Finlay. 2016. "Human Microbiota-Associated Mice: A Model with Challenges." *Cell Host & Microbe* 19 (5). Elsevier: 575–78. https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.04.014.

Arvanitis, Marios, De-Dong Li, Kiho Lee, and Eleftherios Mylonakis. 2013. "Apoptosis in *C. Elegans*: Lessons for Cancer and Immunity." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 3 (October): 10–13. https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00067.

Ashida, Nobuhisa, Sae Yanagihara, Tadashi Shinoda, and Naoyuki Yamamoto. 2011. "Characterization of Adhesive Molecule with Affinity to Caco-2 Cells in *Lactobacillus Acidophilus* by Proteome Analysis." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 112 (4). Elsevier: 333–37. https://doi.org/10.1016/J.JBIOSC.2011.06.001.

Avery, L., and Boris B Shtonda. 2003. "Food Transport in the *C. Elegans* Pharynx." *Journal of*

Experimental Biology 206 (14): 2441–57. https://doi.org/10.1242/jeb.00433.

Avery, Leon, and Young-Jai You. 2012. "*C. Elegans* Feeding." *WormBook : The Online Review of C. Elegans Biology*, May. NIH Public Access, 1–23. https://doi.org/10.1895/wormbook.1.150.1.

-B—

Balla, Keir M., and Emily R. Troemel. 2013. "*Caenorhabditis Elegans* as a Model for Intracellular Pathogen Infection." *Cellular Microbiology*. https://doi.org/10.1111/cmi.12152.

Barrière, Antoine, and Marie-Anne Félix. 2006. "Isolation of *C. Elegans* and Related Nematodes." *WormBook : The Online Review of C. Elegans Biology*, 1–9. https://doi.org/10.1895/wormbook.1.115.1.

Barros, Patrícia Pimentel de, Liliana Scorzoni, Felipe de Camargo Ribeiro, Luciana Ruano de Oliveira Fugisaki, Beth Burgwyn Fuchs, Eleftherios Mylonakis, Antonio Olavo Cardoso Jorge, Juliana Campos Junqueira, and Rodnei Dennis Rossoni. 2018. "*Lactobacillus Paracasei* 28.4 Reduces *in Vitro* Hyphae Formation of *Candida Albicans* and Prevents the Filamentation in an Experimental Model of *Caenorhabditis Elegans*." *Microbial Pathogenesis* 117 (November 2017). Elsevier Ltd: 80–87. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.019.

Beigi, Richard H., Michele N. Austin, Leslie A. Meyn, Marijane A. Krohn, and Sharon L. Hillier. 2004. "Antimicrobial Resistance Associated with the Treatment of Bacterial Vaginosis." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 191 (4): 1124–29. https://doi.org/10.1016/j.ajog.2004.05.033.

Bercik, Premysl, Elena F. Verdu, Jane A. Foster, Joseph Macri, Murray Potter, Xiaxing Huang, Paul Malinowski, et al. 2010. "Chronic Gastrointestinal Inflammation Induces Anxiety-Like Behavior and Alters Central Nervous System Biochemistry in Mice." *Gastroenterology* 139 (6): 2102-2112.e1. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.06.063.

Bhardwaj, Arun, Hittu Gupta, Suman Kapila, Gurpreet Kaur, Shilpa Vij, and Ravinder Kumar Malik. 2010. "Safety Assessment and Evaluation of Probiotic Potential of Bacteriocinogenic *Enterococcus Faecium* KH 24 Strain under *in Vitro* and *in Vivo* Conditions." *International Journal of Food Microbiology* 141 (3): 156–64. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.05.001.

biose. 2016. "API—Biose ® | La Santé Par Le Microbiote." 2016. http://www.biose.com/fr/api/.

Blum, Jessamina E, Caleb N Fischer, Jessica Miles, and Jo Handelsman. 2013. "Frequent Replenishment Sustains the Beneficial Microbiome of *Drosophila Melanogaster*." *MBio* 4 (6). American Society for Microbiology: e00860-13. https://doi.org/10.1128/mBio.00860-13.

Bohbot, J. M., and J. M. Cardot. 2012. "Vaginal Impact of the Oral Administration of Total Freeze-Dried Culture of LCR 35 in Healthy Women." *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology* 2012. https://doi.org/10.1155/2012/503648.

Boris, S, J E Suárez, and C Barbés. 1997. "Characterization of the Aggregation Promoting Factor from *Lactobacillus Gasseri*, a Vaginal Isolate." *Journal of Applied Microbiology* 83 (4): 413–20. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9351223.

Boris, S, J E Suárez, F Vázquez, and C Barbés. 1998. "Adherence of Human Vaginal Lactobacilli to Vaginal Epithelial Cells and Interaction with Uropathogens." *Infection and Immunity* 66 (5): 1985–89. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9573080.

Brancho, Deborah, Nobuyuki Tanaka, Anja Jaeschke, Juan-Jose Ventura, Nyaya Kelkar, Yoshinori Tanaka, Masanao Kyuuma, Toshikazu Takeshita, Richard A Flavell, and Roger J Davis. 2003. "Mechanism of P38 MAP Kinase Activation *in Vivo*." *Genes & Development* 17 (16). Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1969–78. https://doi.org/10.1101/gad.1107303.

Brand, Alexandra, and Neil AR Gow. 2009. "Mechanisms of Hypha Orientation of Fungi." *Current Opinion in Microbiology* 12 (4). Elsevier Current Trends: 350–57. https://doi.org/10.1016/J.MIB.2009.05.007.

Brand, Alexandra, Scott Shanks, Vanessa M.S. Duncan, Meng Yang, Kevin Mackenzie, and Neil A.R. Gow. 2007. "Hyphal Orientation of *Candida Albicans* Is Regulated by a Calcium-Dependent Mechanism." *Current Biology* 17 (4): 347–52. https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.12.043.

Brand, Alexandra, Anjalee Vacharaksa, Catherine Bendel, Jennifer Norton, Paula Haynes, Michelle Henry-Stanley, Carol Wells, Karen Ross, Neil A. R. Gow, and Cheryl A. Gale. 2008. "An Internal Polarity Landmark Is Important for Externally Induced Hyphal Behaviors in *Candida Albicans*." *Eukaryotic Cell* 7 (4): 712–20. https://doi.org/10.1128/EC.00453-07.

Brooijmans, R J W, W M de Vos, and J Hugenholtz. 2009. "*Lactobacillus Plantarum* WCFS1 Electron Transport Chains." *Applied and Environmental Microbiology* 75 (11). American Society for Microbiology (ASM): 3580–85. https://doi.org/10.1128/AEM.00147-09.

Bu, Ling Nan, Mei Hwei Chang, Yen Hsuan Ni, Huey Ling Chen, and Chia Chi Cheng. 2007. "*Lactobacillus Casei Rhamnosus* Lcr35 in Children with Chronic Constipation." *Pediatrics International* 49 (4). John Wiley & Sons, Ltd (101,111): 485–90. https://doi.org/10.1111/j.1442-200X.2007.02397.x.

Burguin, Emilie. 2014. "Probiotiques et Prébiotiques, Intérêt Chez l'enfant : De l'aliment Au Médicament." Université de Nantes.

-C –

Cani, P. D., A. M. Neyrinck, F. Fava, C. Knauf, R. G. Burcelin, K. M. Tuohy, G. R. Gibson, and N. M. Delzenne. 2007. "Selective Increases of Bifidobacteria in Gut Microflora Improve High-Fat-Diet-Induced Diabetes in Mice through a Mechanism Associated with Endotoxaemia." *Diabetologia* 50 (11): 2374–83. https://doi.org/10.1007/s00125-007-0791-0.

Carlsson, Peter, and Margit Mahlapuu. 2002. "Forkhead Transcription Factors: Key Players in Development and Metabolism." *Developmental Biology* 250 (1): 1–23. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12297093.

Cassidy, Liam, Carola Petersen, Christian Treitz, Katja Dierking, Hinrich Schulenburg, Matthias Leippe, and Andreas Tholey. 2018. "The *Caenorhabditis Elegans* Proteome Response to Naturally Associated Microbiome Members of the Genus *Ochrobactrum*." *PROTEOMICS* 18 (8): 1,700,426. https://doi.org/10.1002/pmic.201700426.

Castellarin, Mauro, René L Warren, J Douglas Freeman, Lisa Dreolini, Martin Krzywinski, Jaclyn Strauss, Rebecca Barnes, et al. 2012. "*Fusobacterium Nucleatum* Infection Is Prevalent in Human Colorectal Carcinoma." *Genome Research* 22 (2). Cold Spring Harbor Laboratory Press: 299–306. https://doi.org/10.1101/gr.126516.111.

Cezairliyan, Brent, Nawaporn Vinayavekhin, Daniel Grenfell-Lee, Grace J. Yuen, Alan Saghatelian, and Frederick M. Ausubel. 2013. "Identification of *Pseudomonas Aeruginosa* Phenazines That Kill *Caenorhabditis Elegans*." Edited by David S. Schneider. *PLoS Pathogens* 9 (1). Public Library of Science: e1003101. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003101.

Chalfie, M, Y Tu, G Euskirchen, W. Ward, and D. Prasher. 1994. "Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression." *Science* 263 (5148): 802–5. https://doi.org/10.1126/science.8303295.

Champs, Christophe de, Nathalie Maroncle, Damien Balestrino, Chantal Rich, and Christiane Forestier. 2003. "Persistence of Colonization of Intestinal Mucosa by a Probiotic Strain, *Lactobacillus Casei* Subsp. *Rhamnosus* Lcr35, after Oral Consumption." *Journal of Clinical Microbiology* 41 (3): 1270–73. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12624065.

Chang, Ching-Wei, Chia-Yuan Liu, Hung-Chang Lee, Yen-Hua Huang, Li-Hui Li, Jen-Shiu Chiang Chiau, Tsang-En Wang, et al. 2018. "*Lactobacillus Casei* Variety *Rhamnosus* Probiotic Preventively Attenuates 5-Fluorouracil/Oxaliplatin-Induced Intestinal Injury in a Syngeneic Colorectal Cancer Model." *Frontiers in Microbiology* 9 (May). Frontiers: 983. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00983.

Chang, Lufen, and Michael Karin. 2001. "Mammalian MAP Kinase Signalling Cascades." *Nature* 410 (6824): 37–40. https://doi.org/10.1038/35065000.

Charles, P. E., A. Large, J. P. Quenot, and F. Dalle. 2016. "Épidémiologie Des Candidoses Invasives En France. " *Reanimation* 25: 37–43. https://doi.org/10.1007/s13546-016-1183-6.

Chaston, John M., Peter D. Newell, and Angela E. Douglas. 2014. "Metagenome-Wide Association of Microbial Determinants of Host Phenotype in *Drosophila Melanogaster*." *MBio* 5 (5). American Society for Microbiology: e01631-14. https://doi.org/10.1128/MBIO.01631-14.

Chávez, Violeta, Akiko Mohri-Shiomi, and Danielle A Garsin. 2009. "Ce-Duox1/BLI-3 Generates Reactive Oxygen Species as a Protective Innate Immune Mechanism in *Caenorhabditis Elegans*." *Infection and Immunity* 77 (11): 4983–89. https://doi.org/10.1128/IAI.00627-09.

Chelliah, Ramachandran, Jung-Gu Choi, Su-Bin Hwang, Byung-Jae Park, Eric Banan-Mwine Daliri, Se-Hun Kim, Shuai Wei, Sudha Rani Ramakrishnan, and Deog-Hwan Oh. 2018. "*In Vitro* and *in Vivo*

Defensive Effect of Probiotic LAB against *Pseudomonas Aeruginosa* Using *Caenorhabditis Elegans* Model." *Virulence* 9 (1). Taylor & Francis: 1489–1507. https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1518088.

Chen, Yi-Wei, Wen-Chien Ko, Chang-Shi Chen, and Po-Lin Chen. 2018. "Evaluating Virulence and Pathogenesis of *Aeromonas* Infection in a *Caenorhabditis Elegans* Model." *Journal of Visualized Experiments*, no. 142 (December). https://doi.org/10.3791/58768.

Cheng, G., K. Wozniak, M. A. Wallig, P. L. Fidel, S. R. Trupin, and L. L. Hoyer. 2005. "Comparison between *Candida Albicans* Agglutinin-Like Sequence Gene Expression Patterns in Human Clinical Specimens and Models of Vaginal Candidiasis." *Infection and Immunity* 73 (3): 1656–63. https://doi.org/10.1128/IAI.73.3.1656-1663.2005.

Cheng, Jing, Airi M. Palva, Willem M. De Vos, and Reetta Satokari. 2013. "Contribution of the Intestinal Microbiota to Human Health: From Birth to 100 Years of Age." *Current Topics in Microbiology and Immunology* 358: 323—46. https://doi.org/10.1007/82_2011_189.

Cherbuy, C, M Thomas, and P Langella. 2013. "Le Microbiote Intestinal : Une Composante Santé Qui Évolue Avec l'âge. " *Innovations Agronomiques* 33 : 37–46.

Choi, Eun Ah, and Hae Choon Chang. 2015. "Cholesterol-Lowering Effects of a Putative Probiotic Strain *Lactobacillus Plantarum* EM Isolated from Kimchi." *LWT—Food Science and Technology* 62 (1): 210–17. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.019.

Chou, T-C., H-C. Chiu, C-J. Kuo, C-M. Wu, W-J. Syu, W-T. Chiu, and C-S. Chen. 2013. "Enterohaemorrhagic *Escherichia Coli* O157:H7 Shiga-like Toxin 1 Is Required for Full Pathogenicity and Activation of the P38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway in *Caenorhabditis Elegans*." *Cellular Microbiology* 15 (1): 82–97. https://doi.org/10.1111/cmi.12030.

Chung, Hachung, Sünje J Pamp, Jonathan A Hill, Neeraj K Surana, Sanna M Edelman, Erin B Troy, Nicola C Reading, et al. 2012. "Gut Immune Maturation Depends on Colonization with a Host-Specific Microbiota." *Cell* 149 (7). Elsevier : 1578–93. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.037.

Clark, Laura C., and Jonathan Hodgkin. 2014. "Commensals, Probiotics and Pathogens in the *Caenorhabditis Elegans* Model." *Cellular Microbiology* 16 (1): 27–38. https://doi.org/10.1111/cmi.12234.

Cohen, Lianne B, and Emily R Troemel. 2015. "Microbial Pathogenesis and Host Defense in the Nematode *C. Elegans*." *Current Opinion in Microbiology*. https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.11.009.

Collins, Stephen M., and Premsyl Bercik. 2009. "The Relationship Between Intestinal Microbiota and the Central Nervous System in Normal Gastrointestinal Function and Disease." *Gastroenterology* 136 (6): 2003–14. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.01.075.

Collins, Stephen M., Michael Surette, and Premysl Bercik. 2012. "The Interplay between the Intestinal Microbiota and the Brain." *Nature Reviews Microbiology* 10 (11). Nature Publishing Group: 735–42. https://doi.org/10.1038/nrmicro2876.

Coolon, Joseph D., Kenneth L. Jones, Timothy C. Todd, Bryanua C. Carr, and Michael A. Herman. 2009. "*Caenorhabditis Elegans* Genomic Response to Soil Bacteria Predicts Environment-Specific Genetic Effects on Life History Traits." Edited by Stuart K. Kim. *PLoS Genetics* 5 (6): e1000503. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000503.

Corsi, Ann K., Bruce Wightman, and Martin Chalfie. 2015. "A Transparent Window into Biology: A Primer on *Caenorhabditis Elegans*." *Genetics* 200 (2): 387–407. https://doi.org/10.1534/genetics.115.176099.

Coudeyras, Sophie, Gwendoline Jugie, Marion Vermerie, and Christiane Forestier. 2008. "Adhesion of Human Probiotic *Lactobacillus Rhamnosus* to Cervical and Vaginal Cells and Interaction with Vaginosis-Associated Pathogens." *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology* 2008 (January). Hindawi: 549,640. https://doi.org/10.1155/2008/549640.

Coudeyras, Sophie, Hélène Marchandin, Céline Fajon, and Christiane Forestier. 2008. "Taxonomic and Strain-Specific Identification of the Probiotic Strain *Lactobacillus Rhamnosus* 35 within the *Lactobacillus Casei* Group." *Applied and Environmental Microbiology* 74 (9). American Society for Microbiology (ASM): 2679–89. https://doi.org/10.1128/AEM.02286-07.

Couillault, C, and C. Leopold Kurz. 2010. "Du Nématode *Caenorhabditis Elegans* et de Son Utilisation

En Laboratoire. " *Stal* 36 : 59–74.

Couillault, Carole, Nathalie Pujol, Jérôme Reboul, Laurence Sabatier, Jean-François Guichou, Yuji Kohara, and Jonathan J Ewbank. 2004. "TLR-Independent Control of Innate Immunity in *Caenorhabditis Elegans* by the TIR Domain Adaptor Protein TIR-1, an Ortholog of Human SARM." *Nature Immunology* 5 (5): 488–94. https://doi.org/10.1038/ni1060.

Curt, Alexander, Jiuli Zhang, Justin Minnerly, and Kailiang Jia. 2014. "Intestinal Autophagy Activity Is Essential for Host Defense against *Salmonella* Typhimurium Infection in *Caenorhabditis Elegans*." *Developmental and Comparative Immunology* 45 (2). Elsevier Ltd: 214–18. https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.03.009.

Cutting, Simon M. 2011. "*Bacillus* Probiotics." *Food Microbiology* 28 (2): 214–20. https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.007.

Czerucka, D., T. Piche, and P. Rampal. 2007. "Review Article: Yeast as Probiotics—*Saccharomyces Boulardii*." *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 26 (6): 767–78. https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03442.x.

-D—

Dapito, Dianne H., Ali Mencin, Geum-Youn Gwak, Jean-Philippe Pradere, Myoung-Kuk Jang, Ingmar Mederacke, Jorge M. Caviglia, et al. 2012. "Promotion of Hepatocellular Carcinoma by the Intestinal Microbiota and TLR4." *Cancer Cell* 21 (4): 504–16. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.007.

Dapoigny, Michel, Thierry Piche, Philippe Ducrotte, Bernard Lunaud, Jean Michel Cardot, and Annick Bernalier-Donadille. 2012. "Efficacy and Safety Profile of LCR35 Complete Freeze-Dried Culture in Irritable Bowel Syndrome: A Randomized, Double-Blind Study." *World Journal of Gastroenterology* 18 (17): 2067–75. https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i17.2067.

Darbaky, Y., B. Evrard, S. Patrier, J. Falenta, S. Garcin, A. Tridon, M. Dapoigny, C. Silberberg, A. Nivoliez, and L. Diop. 2016. "Oral Probiotic Treatment of *Lactobacillus Rhamnosus* Lcr35 ® Prevents Visceral Hypersensitivity to a Colonic Inflammation and an Acute Psychological Stress." *Journal of Applied Microbiology* 122 (2001). John Wiley & Sons, Ltd (101,111): 188–200. https://doi.org/10.1111/jam.13320.

Darby, Creg. 2005. "Interactions with Microbial Pathogens." *WormBook*. https://doi.org/10.1895/wormbook.1.21.1.

Dausset, Caroline. 2015. "Détermination Des Mécanismes d'inhibition de Souches de Lactobacilles. Influence Du Procédé Industriel Sur Leurs Caractéristiques Probiotiques." AgroParisTech.

Dausset, Caroline, Stéphane Patrier, Pawel Gajer, Claudia Thoral, Yann Lenglet, Jean Michel Cardot, Philippe Judlin, Jacques Ravel, and Adrien Nivoliez. 2018. "Comparative Phase I Randomized Open-Label Pilot Clinical Trial of Gynophilus® (Lcr Regenerans®) Immediate Release Capsules versus Slow Release Muco-Adhesive Tablets." *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 37 (10): 1869–80. https://doi.org/10.1007/s10096-018-3321-8.

Davis, Daniel J., Elizabeth C. Bryda, Catherine H. Gillespie, and Aaron C. Ericsson. 2016. "Microbial Modulation of Behavior and Stress Responses in Zebrafish Larvae." *Behavioural Brain Research* 311 (September): 219–27. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.05.040.

Delgado, Susana, Raúl Cabrera-Rubio, Alex Mira, Adolfo Suárez, and Baltasar Mayo. 2013. "Microbiological Survey of the Human Gastric Ecosystem Using Culturing and Pyrosequencing Methods." *Microbial Ecology* 65 (3): 763–72. https://doi.org/10.1007/s00248-013-0192-5.

Delzenne, Nathalie M., Audrey M. Neyrinck, Fredrik Bäckhed, and Patrice D. Cani. 2011. "Targeting Gut Microbiota in Obesity: Effects of Prebiotics and Probiotics." *Nature Reviews Endocrinology* 7 (11): 639–46. https://doi.org/10.1038/nrendo.2011.126.

Derrien, Muriel, Peter Van Baarlen, Guido Hooiveld, Elisabeth Norin, Michael Müller, and Willem M. de Vos. 2011. "Modulation of Mucosal Immune Response, Tolerance, and Proliferation in Mice Colonized by the Mucin-Degrader *Akkermansia Muciniphila*." *Frontiers in Microbiology* 2: 166. https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00166.

Desbonnet, L., L. Garrett, G. Clarke, B. Kiely, J.F. Cryan, and T.G. Dinan. 2010. "Effects of the Probiotic *Bifidobacterium Infantis* in the Maternal Separation Model of Depression." *Neuroscience* 170 (4):

1179–88. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.08.005.

Desbonnet, Lieve, Lillian Garrett, Gerard Clarke, John Bienenstock, and Timothy G. Dinan. 2008. "The Probiotic *Bifidobacteria Infantis*: An Assessment of Potential Antidepressant Properties in the Rat." *Journal of Psychiatric Research* 43 (2): 164–74. https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2008.03.009.

Dierking, Katja, Wentao Yang, and Hinrich Schulenburg. 2016. "Antimicrobial Effectors in the Nematode *Caenorhabditis Elegans* : An Outgroup to the *Arthropoda*." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 371 (1695): 20,150,299. https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0299.

DiGiulio, Daniel B, Benjamin J Callahan, Paul J McMurdie, Elizabeth K Costello, Deirdre J Lyell, Anna Robaczewska, Christine L Sun, et al. 2015. "Temporal and Spatial Variation of the Human Microbiota during Pregnancy." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (35). National Academy of Sciences: 11,060–65. https://doi.org/10.1073/pnas.1502875112.

Diogo, Jesica, and Ana Bratanich. 2014. "The Nematode *Caenorhabditis Elegans* as a Model to Study Viruses." *Archives of Virology* 159 (11): 2843–51. https://doi.org/10.1007/s00705-014-2168-2.

Donato, Verónica, Facundo Rodríguez Ayala, Sebastián Cogliati, Carlos Bauman, Juan Gabriel Costa, Cecilia Leñini, and Roberto Grau. 2017. "*Bacillus Subtilis* Biofilm Extends *Caenorhabditis Elegans* Longevity through Downregulation of the Insulin-like Signalling Pathway." *Nature Communications* 8: 14332. https://doi.org/10.1038/ncomms14332.

Dong, Xintong, Oliver W Liu, Audrey S Howell, and Kang Shen. 2013. "An Extracellular Adhesion Molecule Complex Patterns Dendritic Branching and Morphogenesis." *Cell* 155 (2). Howard Hughes Medical Institute: 296–307. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.059.

Douglas, Angela E. 2018. "Which Experimental Systems Should We Use for Human Microbiome Science?" *PLOS Biology* 16 (3). Public Library of Science: e2005245. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005245.

Drissi, F, V Merhej, E Angelakis, A El Kaoutari, F Carrière, B Henrissat, and D Raoult. 2014. "Comparative Genomics Analysis of *Lactobacillus* Species Associated with Weight Gain or Weight Protection." *Nutrition & Diabetes* 4 (2): e109. https://doi.org/10.1038/nutd.2014.6.

Duc, Le H, Huynh A Hong, Teresa M Barbosa, Adriano O Henriques, and Simon M Cutting. 2004. "Characterization of *Bacillus* Probiotics Available for Human Use." *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* 70 (4): 2161–71. https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.2161–2171.2004.

Duncker, Swantje C., Takeshi Kamiya, Lu Wang, Pingchang Yang, and John Bienenstock. 2011. "Probiotic *Lactobacillus Reuteri* Alleviates the Response to Gastric Distension in Rats." *The Journal of Nutrition* 141 (10). Narnia: 1813–18. https://doi.org/10.3945/jn.110.136689.

DuPont, Andrew W., and Herbert L. DuPont. 2011. "The Intestinal Microbiota and Chronic Disorders of the Gut." *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 8 (9): 523–31. https://doi.org/10.1038/nrgastro.2011.133.

-E-

Edwards-Ingram, Laura, Paul Gitsham, Nicola Burton, Geoff Warhurst, Ian Clarke, David Hoyle, Stephen G Oliver, and Lubomira Stateva. 2007. "Genotypic and Physiological Characterization of *Saccharomyces Boulardii*, the Probiotic Strain of *Saccharomyces Cerevisiae*." *Applied and Environmental Microbiology* 73 (8): 2458–67. https://doi.org/10.1128/AEM.02201-06.

Engelmann, Ilka, Aurélien Griffon, Laurent Tichit, Frédéric Montañana-Sanchis, Guilin Wang, Valerie Reinke, Robert H. Waterston, La Deana W. Hillier, and Jonathan J. Ewbank. 2011. "A Comprehensive Analysis of Gene Expression Changes Provoked by Bacterial and Fungal Infection in *C. Elegans*." *PLoS ONE* 6 (5). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019055.

Engelmann, Ilka, and Nathalie Pujol. 2010. "Innate Immunity in *C.Elegans*." *Invertebrate Immunity*, 105–19.

Ericsson, Aaron C. 2019. "The Use of Non-Rodent Model Species in Microbiota Studies." *Laboratory Animals* 53 (3): 259–70. https://doi.org/10.1177/0023677219834593.

Erkosar, Berra, Gilles Storelli, Arnaud Defaye, and François Leulier. 2013. "Host-Intestinal Microbiota Mutualism: 'Learning on the Fly.'" *Cell Host & Microbe* 13 (1): 8–14. https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.12.004.

Evrard, Bertrand, Sophie Coudeyras, Annie Dosgilbert, Nicolas Charbonnel, Josette Alamé, Arlette Tridon, and Christiane Forestier. 2011. "Dose-Dependent Immunomodulation of Human Dendritic Cells by the Probiotic *Lactobacillus Rhamnosus* Lcr35." *PLoS ONE* 6 (4): 1–12. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018735.

Ewald, Collin Yvès, Jorge Iván Castillo-Quan, and T. Keith Blackwell. 2018. "Untangling Longevity, Dauer, and Healthspan in *Caenorhabditis Elegans* Insulin/IGF-1-Signalling." *Gerontology* 64 (1): 96–104. https://doi.org/10.1159/000480504.

Ewbank, J. J., and O. Zugasti. 2011. "*C. Elegans*: Model Host and Tool for Antimicrobial Drug Discovery." *Disease Models & Mechanisms* 4 (3): 300–304. https://doi.org/10.1242/dmm.006684.

Ewbank, Jonathan. 2006. "Signaling in the Immune Response." *WormBook* 1. WormBook. https://doi.org/10.1895/wormbook.1.83.1.

Ezenwa, V. O., N. M. Gerardo, D. W. Inouye, M. Medina, and J. B. Xavier. 2012. "Animal Behavior and the Microbiome." *Science* 338 (6104): 198–99. https://doi.org/10.1126/science.1227412.

-F—

Fallon, John, Judy Kelly, and Kevin Kavanagh. 2012. "*Galleria Mellonella* as a Model for Fungal Pathogenicity Testing." In , 469–85. Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-539-8_33.

Famularo, G., M. Pieluigi, R. Coccia, P. Mastroiacovo, C.De Simone, and C De Simone. 2001. "Microecology, Bacterial Vaginosis and Probiotics: Perspectives for Bacteriotherapy." *Medical Hypotheses* 56 (4): 421–30. https://doi.org/10.1054/mehy.2000.1195.

FAO, and WHO. 2001. "Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria." *Food and Nutrition Paper*. https://doi.org/10.1201/9781420009613.ch16.

Farhan, Mohammed A, Ahmed M Moharram, Tareq Salah, and Omar M Shaaban. 2019. "Types of Yeasts That Cause Vulvovaginal Candidiasis in Chronic Users of Corticosteroids." *Medical Mycology* 57 (6): 681–87. https://doi.org/10.1093/mmy/myy117.

Fasseas, Michael K., Costas Fasseas, Konstantinos C. Mountzouris, and Popi Syntichaki. 2013. "Effects of *Lactobacillus Salivarius*, *Lactobacillus Reuteri*, and *Pediococcus Acidilactici* on the Nematode *Caenorhabditis Elegans* Include Possible Antitumor Activity." *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (5): 2109–18. https://doi.org/10.1007/s00253-012-4357-9.

Fatima, Soobiya, Rizwanul Haque, Pooja Jadiya, Shamsuzzama, Lalit Kumar, and Aamir Nazir. 2014. "Ida-1, the *Caenorhabditis Elegans* Orthologue of Mammalian Diabetes Autoantigen IA-2, Potentially Acts as a Common Modulator between Parkinson's Disease and Diabetes: Role of Daf-2/Daf-16 Insulin like Signalling Pathway." *PLoS ONE* 9 (12). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113986.

Fidel, P.L. 2006. "*Candida*—Host Interactions in HIV Disease: Relationships in Oropharyngeal Candidiasis." *Advances in Dental Research* 19 (1). SAGE Publications : 80–84. https://doi.org/10.1177/154407370601900116.

Filippo, C. De, D. Cavalieri, M. Di Paola, M. Ramazzotti, J. B. Poullet, S. Massart, S. Collini, G. Pieraccini, and P. Lionetti. 2010. "Impact of Diet in Shaping Gut Microbiota Revealed by a Comparative Study in Children from Europe and Rural Africa." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (33): 14,691–96. https://doi.org/10.1073/pnas.1005963107.

Fontana, L., L. Partridge, and V. D. Longo. 2010. "Extending Healthy Life Span—From Yeast to Humans." *Science* 328 (5976). NIH Public Access: 321–26. https://doi.org/10.1126/science.1172539.

Forestier, C, C De Champs, C Vatoux, and B Joly. 2001. "Probiotic Activities of *Lactobacillus Casei Rhamnosus*: *In Vitro* Adherence to Intestinal Cells and Antimicrobial Properties." *Research in Microbiology* 152 (2): 167–73. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11316370.

Fredricks, David N., Tina L. Fiedler, and Jeanne M. Marrazzo. 2005. "Molecular Identification of Bacteria Associated with Bacterial Vaginosis." *New England Journal of Medicine* 353 (18): 1899–1911. https://doi.org/10.1056/NEJMoa043802.

Freestone, Primrose P.E., Sara M. Sandrini, Richard D. Haigh, and Mark Lyte. 2008. "Microbial

Endocrinology: How Stress Influences Susceptibility to Infection." *Trends in Microbiology* 16 (2): 55–64. https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.11.005.

Fuchs, Beth Burgwyn, Elizabeth O'Brien, Joseph B. El Khoury, and Eleftherios Mylonakis. 2010. "Methods for Using *Galleria Mellonella* as a Model Host to Study Fungal Pathogenesis." *Virulence* 1 (6). Taylor & Francis: 475–82. https://doi.org/10.4161/viru.1.6.12985.

Fujiya, Mikihiro, Mark W. Musch, Yasushi Nakagawa, Shien Hu, John Alverdy, Yutaka Kohgo, Olaf Schneewind, Bana Jabri, and Eugene B. Chang. 2007. "The *Bacillus Subtilis* Quorum-Sensing Molecule CSF Contributes to Intestinal Homeostasis via OCTN2, a Host Cell Membrane Transporter." *Cell Host and Microbe* 1 (4): 299–308. https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.05.004.

Fukui, Hirokazu, Tadayuki Oshima, Yoshiki Tanaka, Yosuke Oikawa, Yutaka Makizaki, Hiroshi Ohno, Toshihiko Tomita, Jiro Watari, and Hiroto Miwa. 2018. "Effect of Probiotic *Bifidobacterium Bifidum* G9-1 on the Relationship between Gut Microbiota Profile and Stress Sensitivity in Maternally Separated Rats." *Scientific Reports* 8 (1). Nature Publishing Group: 12,384. https://doi.org/10.1038/s41598-018-30943-3.

-G—

Gago, Sara, Rocío García-Rodas, Isabel Cuesta, Emilia Mellado, and Ana Alastruey-Izquierdo. 2014. "*Candida Parapsilosis* , *Candida Orthopsilosis* , and *Candida Metapsilosis* Virulence in the Non-Conventional Host *Galleria Mellonella*." *Virulence* 5 (2). Taylor & Francis: 278–85. https://doi.org/10.4161/viru.26973.

Gajer, P., R. M. Brotman, G. Bai, J. Sakamoto, U. M. E. Schutte, X. Zhong, S. S. K. Kœnig, et al. 2012. "Temporal Dynamics of the Human Vaginal Microbiota." *Science Translational Medicine* 4 (132): 132ra52-132ra52. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003605.

Gammon, Don B. 2017. "*Caenorhabditis Elegans* as an Emerging Model for Virus-Host Interactions." *Journal of Virology* 91 (23): e00509-17. https://doi.org/10.1128/JVI.00509-17.

Gareau, M. G., E. Wine, D. M. Rodrigues, J. H. Cho, M. T. Whary, D. J. Philpott, G. MacQueen, and P. M. Sherman. 2011. "Bacterial Infection Causes Stress-Induced Memory Dysfunction in Mice." *Gut* 60 (3): 307–17. https://doi.org/10.1136/gut.2009.202515.

Garsin, D. A., C. D. Sifri, E. Mylonakis, X. Qin, K. V. Singh, B. E. Murray, S. B. Calderwood, and F. M. Ausubel. 2001. "A Simple Model Host for Identifying Gram-Positive Virulence Factors." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (19): 10,892–97. https://doi.org/10.1073/pnas.191378698.

Garsin, Danielle A, Jacinto M Villanueva, Jakob Begun, Dennis H Kim, Costi D Sifri, Stephen B Calderwood, Gary Ruvkun, and Frederick M Ausubel. 2003. "Long-Lived *C.Elegans* Daf-2 Mutants Are Resistant to Bacterial Pathogens." *Science* 300 (June): 1921.

Gershon, Michael D. 1999. "The Enteric Nervous System: A Second Brain." *Hospital Practice* 34 (7): 31–52.

Gilbert, J.A., Blaser M.J., Caporaso J.G., Jansson J.K., Lynch S.V., Martin J; ORCID: http://orcid.org/0000-0003-2447-2443 Knight R. AO—Blaser, Jack A Gilbert, et al. 2018. "Current Understanding of the Human Microbiome." *Nature Medicine* 24 (4): 392–400. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1038/nm.4517.

Golden, James W., and Donald L. Riddle. 1984. "The *Caenorhabditis Elegans* Dauer Larva: Developmental Effects of Pheromone, Food, and Temperature." *Developmental Biology* 102 (2). Academic Press: 368–78. https://doi.org/10.1016/0012-1606(84)90,201-X.

Goldstein, Ellie J.C., Kerin L. Tyrrell, and Diane M. Citron. 2015. "*Lactobacillus Species*: Taxonomic Complexity and Controversial Susceptibilities." *Clinical Infectious Diseases* 60 (Suppl 2): S98–107. https://doi.org/10.1093/cid/civ072.

Gómez, E., F. Martín, A.M. Nogacka, N. Salazar, L. Aláez, E. Alcorta, M. Gueimonde, and C.G. De los Reyes-Gavilán. 2019. "Impact of Probiotics on Development and Behaviour in *Drosophila Melanogaster* — a Potential *in Vivo* Model to Assess Probiotics." *Beneficial Microbes* 10 (2): 179–88. https://doi.org/10.3920/BM2018.0012.

Greenbaum, Shirley, Gili Greenbaum, Jacob Moran-Gilad, and Adi Y. Weintruab. 2019. "Ecological Dynamics of the Vaginal Microbiome in Relation to Health and Disease." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 220 (4). Elsevier Inc.: 324–35.

https://doi.org/10.1016/j.ajog.2018.11.1089.

Grompone, Gianfranco, Patricia Martorell, Silvia Llopis, Núria González, Salvador Genovés, Ana Paula Mulet, Tamara Fernández-Calero, et al. 2012. "Anti-Inflammatory Lactobacillus Rhamnosus CNCM I-3690 Strain Protects against Oxidative Stress and Increases Lifespan in Caenorhabditis Elegans." *PLoS ONE* 7 (12). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052493.

Guantario, Barbara, Paola Zinno, Emily Schifano, Marianna Roselli, Giuditta Perozzi, Claudio Palleschi, Daniela Uccelletti, and Chiara Devirgiliis. 2018. "*In Vitro* and *in Vivo* Selection of Potentially Probiotic Lactobacilli from Nocellara Del Belice Table Olives." *Frontiers in Microbiology* 9 (MAR): 595. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00595.

Gueimonde, M., and M.C. Collado. 2012. "Metagenomics and Probiotics." *Clinical Microbiology and Infection* 18 (July): 32–34. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03873.x.

Gumienny, T.L., and C. Savage-Dunn. 2005. "TGF-β Signaling." *WormBook*. https://doi.org/10.1895/wormbook.1.22.1.

Gunther, Luciene Setsuko Akimoto, Helen Priscila Rodrigues Martins, Fabrícia Gimenes, André Luelsdorf Pimenta de Abreu, Marcia Edilaine Lopes Consolaro, Terezinha Inez Estivalet Svidzinski, Luciene Setsuko Akimoto Gunther, et al. 2014. "Prevalence of *Candida Albicans* and Non-Albicans Isolates from Vaginal Secretions: Comparative Evaluation of Colonization, Vaginal Candidiasis and Recurrent Vaginal Candidiasis in Diabetic and Non-Diabetic Women." *Sao Paulo Medical Journal* 132 (2). Associação Paulista de Medicina: 116–20. https://doi.org/10.1590/1516-3180.2014.1322640.

Gusarov, Ivan, Laurent Gautier, Olga Smolentseva, Ilya Shamovsky, Svetlana Eremina, Alexander Mironov, and Evgeny Nudler. 2013. "Bacterial Nitric Oxide Extends the Lifespan of *C. Elegans*." *Cell* 152 (4): 818–30. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.043.

-H—

Han, Jiahuai, Jiing-Dwan Lee, Yong Jiang, Zhuangjie Li, Lili Feng, and Richard J. Ulevitch. 1996. "Characterization of the Structure and Function of a Novel MAP Kinase Kinase (MKK6)." *Journal of Biological Chemistry* 271 (6). American Society for Biochemistry and Molecular Biology: 2886–91. https://doi.org/10.1074/JBC.271.6.2886.

Hardin-Pouzet, Hélène, and Serban Morosan. 2019. "Des Souris, Des Rats et Des Hommes. " *Médecine/Sciences* 35 (5). EDP Sciences : 479–82. https://doi.org/10.1051/medsci/2019082.

Hartmann, Phillipp, Huikuan Chu, Yi Duan, and Bernd Schnabl. 2019. "Gut Microbiota in Liver Disease: Too Much Is Harmful, Nothing at All Is Not Helpful Either." *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 316 (5). American Physiological Society Bethesda, MD : G563—73. https://doi.org/10.1152/ajpgi.00370.2018.

Hatoum, Rima, Steve Labrie, and Ismail Fliss. 2012. "Antimicrobial and Probiotic Properties of Yeasts: From Fundamental to Novel Applications." *Frontiers in Microbiology* 3. Frontiers Media SA: 421. https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00421.

Hattori, Masahira, and Todd D. Taylor. 2009. "The Human Intestinal Microbiome: A New Frontier of Human Biology." *DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes* 16 (1). Oxford University Press: 1. https://doi.org/10.1093/DNARES/DSN033.

Haute Autorité de Santé. 2017. "Actualisation Des Actes de Biologie Médicale Relatifs Au Diagnostic Des Candidoses Invasives." https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2017-10/argumentaire_candidoses_invasives.pdf.

Hedgecock, E M, and J G White. 1985. "Polyploid Tissues in the Nematode *Caenorhabditis Elegans*." *Developmental Biology* 107 (1): 128–33. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2578115.

Heijtz, R. D., S. Wang, F. Anuar, Y. Qian, B. Bjorkholm, A. Samuelsson, M. L. Hibberd, H. Forssberg, and S. Pettersson. 2011. "Normal Gut Microbiota Modulates Brain Development and Behavior." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (7): 3047–52. https://doi.org/10.1073/pnas.1010529108.

Heo, Jaeyoung, Donghyun Shin, Sung Yong Chang, Paul Bogere, Mi Ri Park, Sangdon Ryu, Woong Ji Lee, et al. 2018. "Comparative Genome Analysis and Evaluation of Probiotic Characteristics of

Lactobacillus Plantarum Strain JDFM LP11." *Korean Journal for Food Science of Animal Resources* 38 (5): 878–88. https://doi.org/10.5851/kosfa.2018.e21.

Hertzberger, Rosanne, Jos Arents, Henk L Dekker, R David Pridmore, Christof Gysler, Michiel Kleerebezem, and M Joost Teixeira de Mattos. 2014. "H(2)O(2) Production in Species of the *Lactobacillus Acidophilus* Group: A Central Role for a Novel NADH-Dependent Flavin Reductase." *Applied and Environmental Microbiology* 80 (7). American Society for Microbiology: 2229–39. https://doi.org/10.1128/AEM.04272-13.

Hill, David R, and Jason R Spence. 2017. "Gastrointestinal Organoids: Understanding the Molecular Basis of the Host-Microbe Interface." *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 3 (2). Elsevier: 138–49. https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2016.11.007.

Hoffmann, Christian, Serena Dollive, Stephanie Grunberg, Jun Chen, Hongzhe Li, Gary D. Wu, James D. Lewis, and Frederic D. Bushman. 2013. "Archaea and Fungi of the Human Gut Microbiome: Correlations with Diet and Bacterial Residents." Edited by Chongle Pan. *PLoS ONE* 8 (6). Public Library of Science: e66019. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066019.

Homayouni, Aziz, Parvin Bastani, Somayeh Ziyadi, Sakineh Mohammad-Alizadeh-Charandabi, Morad Ghalibaf, Amir Mohammad Mortazavian, and Elnaz Vaghef Mehrabany. 2014. "Effects of Probiotics on the Recurrence of Bacterial Vaginosis." *Journal of Lower Genital Tract Disease* 18 (1): 79–86. https://doi.org/10.1097/LGT.0b013e31829156ec.

Hoogewijs, David, Koen Houthoofd, Filip Matthijssens, Jo Vandesompele, and Jacques R Vanfleteren. 2008. "Selection and Validation of a Set of Reliable Reference Genes for Quantitative *Sod* Gene Expression Analysis in *C. Elegans*." *BMC Molecular Biology* 9 (January): 9. https://doi.org/10.1186/1471-2199-9-9.

Hooper, L. V., D. R. Littman, and A. J. Macpherson. 2012. "Interactions Between the Microbiota and the Immune System." *Science* 336 (6086): 1268–73. https://doi.org/10.1126/science.1223490.

Hopkins, M. J., and G. T. Macfarlane. 2002. "Changes in Predominant Bacterial Populations in Human Faeces with Age and with *Clostridium Difficile* Infection." *Journal of Medical Microbiology* 51 (5): 448–54. https://doi.org/10.1099/0022-1317-51-5-448.

Hornby, J M, E C Jensen, A D Lisec, J J Tasto, B Jahnke, R Shoemaker, P Dussault, and K W Nickerson. 2001. "Quorum Sensing in the Dimorphic Fungus *Candida Albicans* Is Mediated by Farnesol." *Applied and Environmental Microbiology* 67 (7). American Society for Microbiology: 2982–92. https://doi.org/10.1128/AEM.67.7.2982-2992.2001.

Hu, Patrick J. 2007. "Dauer." *WormBook*, no. 734: 1–19. https://doi.org/10.1895/wormbook.1.144.1.

Hwang, Su-Bin, Jung-gu Choi, Shuai Wei, Byung-Jae Park, Ramachandran Chelliah, and Deog-Hwan Oh. 2018. "*In Vivo* Screening Platform for Shiga Toxin-Producing *Escherichia Coli* (STEC) Using *Caenorhabditis Elegans* as a Model." Edited by Myon-Hee Lee. *PLOS ONE* 13 (2): e0193277. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193277.

-I—

Ianiro, Gianluca, Javier Molina-Infante, and Antonio Gasbarrini. 2015. "Gastric Microbiota." *Helicobacter* 20: 68–71. https://doi.org/10.1111/hel.12260.

Ikeda, Takanori, Chikako Yasui, Kaori Hoshino, Kentaro Arikawa, and Yoshikazu Nishikawa. 2007. "Influence of Lactic Acid Bacteria on Longevity of *Caenorhabditis Elegans* and Host Defense against *Salmonella Enterica* Serovar Enteritidis." *Applied and Environmental Microbiology* 73 (20): 6404–9. https://doi.org/10.1128/AEM.00704-07.

Issi, Luca, Meredith Rioux, and Reeta Rao. 2017. "The Nematode *Caenorhabditis Elegans*—A Versatile *In Vivo* Model to Study Host-Microbe Interactions." *Journal of Visualized Experiments*, no. 128 (October). https://doi.org/10.3791/56487.

-J—

Jacobsen, Ilse D, Duncan Wilson, Betty Wächtler, Sascha Brunke, Julian R Naglik, and Bernhard Hube. 2012. "*Candida Albicans* Dimorphism as a Therapeutic Target." *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 10 (1): 85–93. https://doi.org/10.1586/eri.11.152.

Jain, Charu, Kelly Pastor, Arely Y Gonzalez, Michael C Lorenz, and Reeta P Rao. 2013. "The Role of *Candida Albicans* AP-1 Protein against Host Derived ROS in *in Vivo* Models of Infection."

Virulence 4 (1): 67–76. https://doi.org/10.4161/viru.22700.

Jarde, Alexander, Anne-Mary Lewis-Mikhael, Paul Moayyedi, Jennifer C. Stearns, Stephen M. Collins, Joseph Beyene, and Sarah D. McDonald. 2018. "Pregnancy Outcomes in Women Taking Probiotics or Prebiotics: A Systematic Review and Meta-Analysis." *BMC Pregnancy and Childbirth* 18 (1): 14. https://doi.org/10.1186/s12884-017-1629-5.

Jeanmonod, Rebecca, and Donald Jeanmonod. 2019. *Vaginal Candidiasis (Vulvovaginal Candidiasis)*. *StatPearls*. StatPearls Publishing. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29083806.

Jensen, R.L., K.S. Pedersen, V. Loeschcke, H. Ingmer, and J.J. Leisner. 2007. "Limitations in the Use of *Drosophila Melanogaster* as a Model Host for Gram-Positive Bacterial Infection." *Letters in Applied Microbiology* 44 (2). John Wiley & Sons, Ltd (101,111): 218–23. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02040.x.

Jeon, Hoon, and Dong Seok Cha. 2016. "Anti-Aging Properties of *Ribes Fasciculatum* in *Caenorhabditis Elegans*." *Chinese Journal of Natural Medicines* 14 (5): 335–42. https://doi.org/10.3724/SP.J.1009.2016.00335.

Jia, K., C. Thomas, M. Akbar, Q. Sun, B. Adams-Huet, C. Gilpin, and B. Levine. 2009. "Autophagy Genes Protect against *Salmonella* Typhimurium Infection and Mediate Insulin Signaling-Regulated Pathogen Resistance." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (34): 14,564–69. https://doi.org/10.1073/pnas.0813319106.

Jiang, Hongbing, and David Wang. 2018. "The Microbial Zoo in the *C. Elegans* Intestine: Bacteria, Fungi and Viruses." *Viruses* 10 (2). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). https://doi.org/10.3390/v10020085.

Josende, Marcelo Estrella, Silvana Manske Nunes, Larissa Müller, Marlize Ferreira-Cravo, José Marìa Monserrat, and Juliane Ventura-Lima. 2019. "Circular Estimate Method (CEM)—a Simple Method to Estimate *Caenorhabditis Elegans* Culture Densities in Liquid Medium." *Biological Procedures Online* 21 (1): 1. https://doi.org/10.1186/s12575-018-0089-2.

Junqueira, Juliana Campos. 2012. "Models Hosts for the Study of Oral Candidiasis." In , 95–105. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5638-5_10.

-K-

Kandler, O. 1983. "Carbohydrate Metabolism in Lactic Acid Bacteria." *Antonie van Leeuwenhoek* 49 (3): 209–24. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6354079.

Kaper, J. B., and V. Sperandio. 2005. "Bacterial Cell-to-Cell Signaling in the Gastrointestinal Tract." *Infection and Immunity* 73 (6): 3197–3209. https://doi.org/10.1128/IAI.73.6.3197-3209.2005.

Kashem, Sakeen W, and Daniel H Kaplan. 2016. "Skin Immunity to *Candida Albicans*." *Trends in Immunology* 37 (7). NIH Public Access: 440–50. https://doi.org/10.1016/j.it.2016.04.007.

Kato, Maiko, Yumi Hamazaki, Simo Sun, Yoshikazu Nishikawa, and Eriko Kage-Nakadai. 2018. "*Clostridium Butyricum* MIYAIRI 588 Increases the Lifespan and Multiple-Stress Resistance of *Caenorhabditis Elegans*." *Nutrients* 10 (12). Multidisciplinary Digital Publishing Institute: 1921. https://doi.org/10.3390/nu10121921.

Kato, Yusuke, Tomoyasu Aizawa, Hirokazu Hoshino, Keiichi Kawano, Katsutoshi Nitta, and Hong Zhang. 2002. "*Abf-1* and *Abf-2*, ASABF-Type Antimicrobial Peptide Genes in *Caenorhabditis Elegans*." *The Biochemical Journal* 361 (Pt 2): 221–30. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11772394%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1222302.

Kenyon, Cynthia, Jean Chang, Erin Gensch, Adam Rudner, and Ramon Tabtiang. 1993. "A *C. Elegans* Mutant That Lives Twice as Long as Wild Type." *Nature* 366 (6454). Nature Publishing Group: 461–64. https://doi.org/10.1038/366461a0.

Kenyon, Cynthia J. 2010. "The Genetics of Ageing." *Nature*. https://doi.org/10.1038/nature08980.

Kern, A.M., J.M. Bohbot, and J.M. Cardot. 2012. "Preventive Treat of Vulvovaginal Candidosis with Vaginal Probiotic—Results of the Observational Study Candiflore" 34 (d): 34–37. http://www.edimark.fr/Front/frontpost/getfiles/18390.pdf.

Kim, D. H., N. T. Liberati, T. Mizuno, H. Inoue, N. Hisamoto, K. Matsumoto, and F. M. Ausubel. 2004.

"Integration of *Caenorhabditis Elegans* MAPK Pathways Mediating Immunity and Stress Resistance by MEK-1 MAPK Kinase and VHP-1 MAPK Phosphatase." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (30): 10,990–94. https://doi.org/10.1073/pnas.0403546101.

Kim, Y., K. S. Han, J. Y. Imm, S. Oh, S. You, S. Park, and S. H. Kim. 2006. "Inhibitory Effects of *Lactobacillus Acidophilus* Lysates on the Cytotoxic Activity of Shiga-like Toxin 2 Produced from *Escherichia Coli* O157:H7." *Letters in Applied Microbiology* 43 (5): 502–7. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02005.x.

Kim, Younghoon, and Eleftherios Mylonakis. 2012. "*Caenorhabditis Elegans* Immune Conditioning with the Probiotic Bacterium *Lactobacillus Acidophilus* Strain Ncfm Enhances Gram-Positive Immune Responses." *Infection and Immunity* 80 (7): 2500–2508. https://doi.org/10.1128/IAI.06350-11.

Kirihara, Nami, Masato Kamitomo, Tatsunori Tabira, Takashi Hashimoto, Hiroko Taniguchi, and Takatsugu Maeda. 2018. "Effect of Probiotics on Perinatal Outcome in Patients at High Risk of Preterm Birth." *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 44 (2): 241–47. https://doi.org/10.1111/jog.13497.

Kojic, Erna M, and Rabih O Darouiche. 2004. "*Candida* Infections of Medical Devices." *Clinical Microbiology Reviews* 17 (2). American Society for Microbiology (ASM): 255–67. https://doi.org/10.1128/cmr.17.2.255-267.2004.

Komura, Tomomi, Takanori Ikeda, Chikako Yasui, Shigeru Saeki, and Yoshikazu Nishikawa. 2013. "Mechanism Underlying Prolongevity Induced by Bifidobacteria in *Caenorhabditis Elegans*." *Biogerontology* 14 (1): 73–87. https://doi.org/10.1007/s10522-012-9411-6.

Komura, Tomomi, Chikako Yasui, Hiroshi Miyamoto, and Yoshikazu Nishikawa. 2010. "*Caenorhabditis Elegans* as an Alternative Model Host for *Legionella Pneumophila*, and Protective Effects of *Bifidobacterium Infantis*." *Applied and Environmental Microbiology* 76 (12): 4105–8. https://doi.org/10.1128/AEM.03021-09.

Konturek, P C, D Haziri, T Brzozowski, T Hess, S Heyman, S Kwiecien, S J Konturek, and J Koziel. 2015. "Emerging Role of Fecal Microbiota Therapy in the Treatment of Gastrointestinal and Extra-Gastrointestinal Diseases." *Journal of Physiology and Pharmacology : An Official Journal of the Polish Physiological Society* 66 (4): 483–91. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26348073.

Kostic, Aleksandar D., Michael R. Howitt, and Wendy S. Garrett. 2013. "Exploring Host-Microbiota Interactions in Animal Models and Humans." *Genes and Development* 27 (7): 701–18. https://doi.org/10.1101/gad.212522.112.

Kostic, Aleksandar D, Dirk Gevers, Chandra Sekhar Pedamallu, Monia Michaud, Fujiko Duke, Ashlee M Earl, Akinyemi I Ojesina, et al. 2012. "Genomic Analysis Identifies Association of Fusobacterium with Colorectal Carcinoma." *Genome Research* 22 (2). Cold Spring Harbor Laboratory Press: 292–98. https://doi.org/10.1101/gr.126573.111.

Koyle, Melinda L., Madeline Veloz, Alec M. Judd, Adam C.-N. Wong, Peter D. Newell, Angela E. Douglas, and John M. Chaston. 2016. "Rearing the Fruit Fly *Drosophila Melanogaster* Under Axenic and Gnotobiotic Conditions." *Journal of Visualized Experiments*, no. 113 (July). https://doi.org/10.3791/54219.

Kroon, Samuel J., Jacques Ravel, and Wilhelmina M. Huston. 2018. "Cervicovaginal Microbiota, Women's Health, and Reproductive Outcomes." *Fertility and Sterility* 110 (3): 327–36. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.06.036.

Kumamoto, Carol A. 2008. "Molecular Mechanisms of Mechanosensing and Their Roles in Fungal Contact Sensing." *Nature Reviews Microbiology* 6 (9): 667–73. https://doi.org/10.1038/nrmicro1960.

Kwon, Gayeung, Jiyun Lee, Jong-Ho Koh, and Young-Hee Lim. 2018. "Lifespan Extension of *Caenorhabditis Elegans* by *Butyricicoccus Pullicaecorum* and *Megasphaera Elsdenii* with Probiotic Potential." *Current Microbiology* 75 (5): 557–64. https://doi.org/10.1007/s00284-017-1416-6.

-L—

Lacroix, Christophe, Tomas de Wouters, and Christophe Chassard. 2015. "Integrated Multi-Scale Strategies to Investigate Nutritional Compounds and Their Effect on the Gut Microbiota." *Current Opinion in Biotechnology* 32: 149—55. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.12.009.

Lee, Hye Kyoung, Sun-Hae Choi, Cho Rong Lee, Sun Hee Lee, Mi Ri Park, Younghoon Kim, Myung-Ki

Lee, and Geun-Bae Kim. 2015. “Screening and Characterization of Lactic Acid Bacteria Strains with Anti-Inflammatory Activities through *in Vitro* and *Caenorhabditis Elegans* Model Testing.” *Korean Journal for Food Science of Animal Resources* 35 (1): 91–100. https://doi.org/10.5851/kosfa.2015.35.1.91.

Lee, Jong Geol, Young Hoon Sung, and In-Jeoung Baek. 2018. “Generation of Genetically-Engineered Animals Using Engineered Endonucleases.” *Archives of Pharmacal Research* 41 (9). Pharmaceutical Society of Korea: 885–97. https://doi.org/10.1007/s12272-018-1037-z.

Legouis, Renaud, Sophie Quintin, and Michel Labouesse. 1999. “Séquençage Du Genome de *C. Elegans*; Les Éclats Du Ver. ” *Medecine/Sciences* 15 (5) : 695–700.

Leippe, M. 1999. “Antimicrobial and Cytolytic Polypeptides of Amoeboid Protozoa—Effector Molecules of Primitive Phagocytes.” *Developmental and Comparative Immunology* 23 (4–5): 267–79. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10426421.

Leippe, Matthias. 1995. “Ancient Weapons: NK-Lysin, Is a Mammalian Homolog to Pore-Forming Peptides of a Protozoan Parasite.” *Cell*. https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90229-5.

Lemaitre, Bruno, and Jules Hoffmann. 2007. “The Host Defense of *Drosophila Melanogaster*.” *Annual Review of Immunology* 25 (1): 697–743. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141615.

Lenaerts, Isabelle, Glenda A Walker, Luc Van Hoorebeke, David Gems, and Jacques R Vanfleteren. 2008. “Dietary Restriction of *Caenorhabditis Elegans* by Axenic Culture Reflects Nutritional Requirement for Constituents Provided by Metabolically Active Microbes.” *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences* 63 (3): 242–52. https://doi.org/10.1093/gerona/63.3.242.

Lepargneur, J-P, and V Rousseau. 2012. “Rôle Protecteur de La Flore de Doderleïn. ” *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de La Reproduction* 31 (5) : 485–94. https://doi.org/JGYN-09-2002-31-5-0368-2315-101019-ART7.

Lermann, Ulrich, and Joachim Morschhäuser. 2008. “Secreted Aspartic Proteases Are Not Required for Invasion of Reconstituted Human Epithelia by *Candida Albicans*.” *Microbiology* 154 (11). Microbiology Society: 3281–95. https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/022525-0.

Ley, Ruth E, Daniel A Peterson, and Jeffrey I Gordon. 2006. “Ecological and Evolutionary Forces Shaping Microbial Diversity in the Human Intestine.” *Cell* 124 (4): 837–48. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.017.

Li, Dali, Zhongwei Qiu, Yanjiao Shao, Yuting Chen, Yuting Guan, Meizhen Liu, Yongmei Li, et al. 2013. “Heritable Gene Targeting in the Mouse and Rat Using a CRISPR-Cas System.” *Nature Biotechnology* 31 (8): 681–83. https://doi.org/10.1038/nbt.2661.

Li, Dongyao, Haiqin Chen, Bingyong Mao, Qin Yang, Jianxin Zhao, Zhennan Gu, Hao Zhang, Yong Q Chen, and Wei Chen. 2017. “Microbial Biogeography and Core Microbiota of the Rat Digestive Tract.” *Scientific Reports* 8. Nature Publishing Group: 45,840. https://doi.org/10.1038/srep45840.

Li, Jie, Alla A Aroutcheva, Sebastian Faro, and Michael L Chikindas. 2005. “Mode of Action of Lactocin 160, a Bacteriocin from Vaginal *Lactobacillus Rhamnosus*.” *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology* 13 (3). Hindawi: 135–40. https://doi.org/10.1080/10647440500148156.

Liang, Jun, Ling Yu, Jianghua Yin, and Cathy Savage-Dunn. 2007. “Transcriptional Repressor and Activator Activities of SMA-9 Contribute Differentially to BMP-Related Signaling Outputs.” *Developmental Biology* 305 (2): 714–25. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.02.038.

Ling, Zongxin, Xia Liu, Weiguang Chen, Yueqiu Luo, Li Yuan, Yaxian Xia, Karen E. Nelson, et al. 2013. “The Restoration of the Vaginal Microbiota After Treatment for Bacterial Vaginosis with Metronidazole or Probiotics.” *Microbial Ecology* 65 (3): 773–80. https://doi.org/10.1007/s00248-012-0154-3.

Lints, R., and D.H. Hall. 2009. “Male Introduction.” WormAtlas. 2009. https://doi.org/10.3908/wormatlas.2.1.

Lo, H J, J R Köhler, B DiDomenico, D Loebenberg, A Cacciapuoti, and G R Fink. 1997. “Nonfilamentous *C. Albicans* Mutants Are Avirulent.” *Cell* 90 (5): 939–49. https://doi.org/10.1016/s0092-

8674(00)80358-x.

-M –

Ma, Dali, François Leulier, Gilles Storelli, and Mélanie Mitchell. 2015. "Studying Host-Microbiota Mutualism in *Drosophila*: Harnessing the Power of Gnotobiotic Flies." *Biomedical Journal* 38 (4): 285. https://doi.org/10.4103/2319-4170.158620.

Ma, Liyan, Jianrong Su, Yanli Su, Wei Sun, and Zhaoying Zeng. 2017. "Probiotics Administered Intravaginally as a Complementary Therapy Combined with Antibiotics for the Treatment of Bacterial Vaginosis: A Systematic Review Protocol." *BMJ Open* 7 (10): e019301. https://doi.org/10.1136/bmjopen-2017-019301.

Maccaferri, Simone, Annett Klinder, Patrizia Brigidi, Piero Cavina, and Adele Costabile. 2012. "Potential Probiotic *Kluyveromyces Marxianus* B0399 Modulates the Immune Response in Caco-2 Cells and Peripheral Blood Mononuclear Cells and Impacts the Human Gut Microbiota in an *in Vitro* Colonic Model System." *Applied and Environmental Microbiology* 78 (4): 956–64. https://doi.org/10.1128/AEM.06385-11.

MacNeil, Lesley T., Emma Watson, H. Efsun Arda, Lihua Julie Zhu, and Albertha J M Walhout. 2013. "Diet-Induced Developmental Acceleration Independent of TOR and Insulin in *C. Elegans*." *Cell* 153 (1): 240–52. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.049.

Malazy, Ozra Tabatabaei, Mamak Shariat, Ramin Heshmat, Fereshteh Majlesi, Masoumeh Alimohammadian, Nasibeh Khaleghnejad Tabari, and Bagher Larijani. 2007. "Vulvovaginal Candidiasis and Its Related Factors in Diabetic Women." *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology* 46 (4): 399–404. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18182346.

Malin, Jennifer Zuckerman, and Shai Shaham. 2015. "Cell Death in *C. Elegans* Development." *Current Topics in Developmental Biology* 114. NIH Public Access: 1–42. https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2015.07.018.

Mallo, Gustavo V, C. Léopold Kurz, Carole Couillault, Nathalie Pujol, Samuel Granjeaud, Yuji Kohara, and Jonathan J Ewbank. 2002. "Inducible Antibacterial Defense System in *C. Elegans*." *Current Biology* 12 (14): 1209–14. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00928-4.

Mane, Arati, Chayya Pawale, Shraddha Gaikwad, Shilpa Bembalkar, and Arun Risbud. 2010. "Adherence to Buccal Epithelial Cells, Enzymatic and Hemolytic Activities of *Candida Isolates* from HIV-Infected Individuals." *Medical Mycology* 49 (5). Narnia: 1–4. https://doi.org/10.3109/13693786.2010.540044.

Mango, S E, E J Lambie, and J Kimble. 1994. "The *Pha-4* Gene Is Required to Generate the Pharyngeal Primordium of *Caenorhabditis Elegans*." *Development (Cambridge, England)* 120 (10): 3019–31. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7607089.

Mango, Susan. 2007. "The *C. Elegans* Pharynx: A Model for Organogenesis." *WormBook*, 1–26. https://doi.org/10.1895/wormbook.1.129.1.

Martinez, R.C.R., S.A. Franceschini, M.C. Patta, S.M. Quintana, R.C. Candido, J.C. Ferreira, E.C.P. De Martinis, and G. Reid. 2009. "Improved Treatment of Vulvovaginal Candidiasis with Fluconazole plus Probiotic *Lactobacillus Rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus Reuteri* RC-14." *Letters in Applied Microbiology* 48 (3): 269–74. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02477.x.

Marudhupandiyan, Shanmugam, and Krishnaswamy Balamurugan. 2017. "Intrinsic JNK-MAPK Pathway Involvement Requires *Daf-16*-Mediated Immune Response during *Shigella Flexneri* Infection in *C. Elegans*." *Immunologic Research* 65 (3): 609–21. https://doi.org/10.1007/s12026-016-8879-6.

Marudhupandiyan, Shanmugam, Udayakumar Prithika, Boopathi Balasubramaniam, and Krishnaswamy Balamurugan. 2017. "RACK-1, a Multifaceted Regulator Is Required for *C. Elegans* Innate Immunity against *S. Flexneri* M9OT Infection." *Developmental & Comparative Immunology* 74 (September): 227–36. https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.05.008.

Mavor, A L, S Thewes, and B Hube. 2005. "Systemic Fungal Infections Caused by *Candida* Species: Epidemiology, Infection Process and Virulence Attributes." *Current Drug Targets* 6 (8): 863–74. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16375670.

Mawdsley, J E, and D S Rampton. 2005. "Psychological Stress in IBD: New Insights into Pathogenic and Therapeutic Implications." *Gut* 54 (10): 1481–91. https://doi.org/10.1136/gut.2005.064261.

Mayer, Emeran A. 2011. “Gut Feelings: The Emerging Biology of Gut-Brain Communication.” *Nature Reviews Neuroscience*. https://doi.org/10.1038/nrn3071.

Mayer, François L., Duncan Wilson, and Bernhard Hube. 2013. “*Candida Albicans* Pathogenicity Mechanisms.” *Virulence*. https://doi.org/10.4161/viru.22913.

Mazloom, Kiran, Imran Siddiqi, and Mihai Covasa. 2019. “Probiotics: How Effective Are They in the Fight against Obesity?” *Nutrients* 11 (2). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). https://doi.org/10.3390/nu11020258.

Mccallum, Katie C, and Danielle A Garsin. 2016. “The Role of Reactive Oxygen Species in Modulating the *Caenorhabditis Elegans* Immune Response.” *PLoS Pathogens* 12 (11). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005923.

McFall-Ngai, Margaret, Michael G Hadfield, Thomas C G Bosch, Hannah V Carey, Tomislav Domazet-Lošo, Angela E Douglas, Nicole Dubilier, et al. 2013. “Animals in a Bacterial World, a New Imperative for the Life Sciences.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (9). National Academy of Sciences: 3229–36. https://doi.org/10.1073/pnas.1218525110.

McFarland, Lynne V. 2010. “Systematic Review and Meta-Analysis of *Saccharomyces Boulardii* in Adult Patients.” *World Journal of Gastroenterology* 16 (18): 2202–22. https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i18.2202.

McGhee, James. 2007. “The *C. Elegans* Intestine.” *WormBook*, 1–36. https://doi.org/10.1895/wormbook.1.133.1.

Means, Terry K., Eleftherios Mylonakis, Emmanouil Tampakakis, Richard A. Colvin, Edward Seung, Lindsay Puckett, Melissa F. Tai, et al. 2009. “Evolutionarily Conserved Recognition and Innate Immunity to Fungal Pathogens by the Scavenger Receptors SCARF1 and CD36.” *The Journal of Experimental Medicine* 206 (3): 637–53. https://doi.org/10.1084/jem.20082109.

Meléndez, Alicia. 2009. “Autophagy in *C. Elegans*.” *WormBook*, 1–26. https://doi.org/10.1895/wormbook.1.147.1.

Meyer, C. 2016. “Dictionnaire Des Sciences Animales. ” *Editions Scientifiques*. Montpellier, France : Cirad. http://dico-sciences-animales.cirad.fr/.

Millet, A. C M, and Jonathan J. Ewbank. 2004. “Immunity in *Caenorhabditis Elegans*.” *Current Opinion in Immunology* 16 (1): 4–9. https://doi.org/10.1016/j.coi.2003.11.005.

Mizuguchi, Rumiko, and Takaaki Hirotsu. 2018. “[Early Diagnosis of Cancer Using Nematoda C. Elegans].” *Gan to Kagaku Ryoho. Cancer & Chemotherapy* 45 (6): 916–20. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30026413.

Mohammadi, Rasoul, and Elham Foroughifar. 2016. “*Candida* Infections among Neutropenic Patients.” *Caspian Journal of Internal Medicine* 7 (2): 71–77. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4913707/pdf/cjim-7-071.pdf.

Mondal, Sudip, Evan Hegarty, Chris Martin, Sertan Kutal Gökçe, Navid Ghorashian, and Adela Ben-Yakar. 2016. “Large-Scale Microfluidics Providing High-Resolution and High-Throughput Screening of *Caenorhabditis Elegans* Poly-Glutamine Aggregation Model.” *Nature Communications* 7 (1). Nature Publishing Group: 13,023. https://doi.org/10.1038/ncomms13023.

Mooijaart, S. P., B. W. Brandt, E. A. Baldal, J. Pijpe, M. Kuningas, M. Beekman, B. J. Zwaan, P. E. Slagboom, R. G.J. Westendorp, and D. Van Heemst. 2005. “*C. Elegans* DAF-12, Nuclear Hormone Receptors and Human Longevity and Disease at Old Age.” *Ageing Research Reviews* 4 (3): 351–71. https://doi.org/10.1016/j.arr.2005.03.006.

Moore, W E, and L V Holdeman. 1974. “Human Fecal Flora: The Normal Flora of 20 Japanese-Hawaiians.” *Applied Microbiology* 27 (5): 961–79. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4598229%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC380185.

Mörck, Catarina, and Marc Pilon. 2006. “*C. Elegans* Feeding Defective Mutants Have Shorter Body Lengths and Increased Autophagy.” *BMC Developmental Biology* 6. https://doi.org/10.1186/1471-213X-6-39.

Morita, K, K L Chow, and N Ueno. 1999. “Regulatin of Body Lenght and Male Tail Ray Pattern Formatin

of *Caenorhabditis Elegans* by a Member of TGF-SS." *Development* 126: 1337—47. http://dev.biologists.org/content/develop/126/6/1337.full.pdf.

Morita, Kiyokazu, Anthony J Flemming, Yukiko Sugihara, Makoto Mochii, Yo Suzuki, Satoru Yoshida, William B Wood, et al. 2002. "A *Caenorhabditis Elegans* TGF-Beta, DBL-1, Controls the Expression of LON-1, a PR-Related Protein, That Regulates Polyploidization and Body Length." *The EMBO Journal* 21 (5): 1063–73. https://doi.org/10.1093/emboj/21.5.1063.

Mukherjee, Krishnendu, Ramya Raju, Rainer Fischer, and Andreas Vilcinskas. 2013. "*Galleria Mellonella* as a Model Host to Study Gut Microbe Homeostasis and Brain Infection by the Human Pathogen *Listeria Monocytogenes*." In *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 135:27–39. https://doi.org/10.1007/10_2013_203.

Muller, Claudia, Vincent Mazel, Caroline Dausset, Virginie Busignies, Stéphanie Bornes, Adrien Nivoliez, and Pierre Tchoreloff. 2014. "Study of the *Lactobacillus Rhamnosus* Lcr35® Properties after Compression and Proposition of a Model to Predict Tablet Stability." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 88 (3): 787–94. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.07.014.

Murciano, Celia, David L. Moyes, Manohursingh Runglall, Priscila Tobouti, Ayesha Islam, Lois L. Hoyer, and Julian R. Naglik. 2012. "Evaluation of the Role of *Candida Albicans* Agglutinin-Like Sequence (Als) Proteins in Human Oral Epithelial Cell Interactions." Edited by Neeraj Chauhan. *PLoS ONE* 7 (3): e33362. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033362.

Murphy, Coleen T., Steven A. McCarroll, Cornelia I. Bargmann, Andrew Fraser, Ravi S. Kamath, Julie Ahringer, Hao Li, and Cynthia Kenyon. 2003. "Genes That Act Downstream of DAF-16 to Influence the Lifespan of *Caenorhabditis Elegans*." *Nature* 424 (6946): 277–84. https://doi.org/10.1038/nature01789.

Murphy, Coleen T, and Patrick J. Hu. 2013. "Insulin/Insulin-Life Growth Factor Signaling in *C. Elegans*." *WormBook*, 1–30. https://doi.org/10.1895/wormbook.1.

Muzny, Christina A, and Jane R Schwebke. 2016. "Pathogenesis of Bacterial Vaginosis: Discussion of Current Hypotheses." *The Journal of Infectious Diseases* 214 Suppl 1 (Suppl 1). Oxford University Press: S1-5. https://doi.org/10.1093/infdis/jiw121.

Mysliwy, Justyna, Andrew J. Dingley, Mareike Stanisak, Sascha Jung, Inken Lorenzen, Thomas Roeder, Matthias Leippe, and Joachim Grötzinger. 2010. "Caenopore-5: The Three-Dimensional Structure of an Antimicrobial Protein from *Caenorhabditis Elegans*." *Developmental & Comparative Immunology* 34 (3): 323–30. https://doi.org/10.1016/j.dci.2009.11.003.

-N—

Naglik, Julian R, Stephen J Challacombe, and Bernhard Hube. 2003. "*Candida Albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis." *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* 67 (3). American Society for Microbiology: 400–428, table of contents. https://doi.org/10.1128/mmbr.67.3.400-428.2003.

Nakagawa, Hisako, Takuya Shiozaki, Eiji Kobatake, Tomohiro Hosoya, Tomohiro Moriya, Fumihiko Sakai, Hidenori Taru, and Tadaaki Miyazaki. 2016. "Effects and Mechanisms of Prolongevity Induced by *Lactobacillus Gasseri* SBT2055 in *Caenorhabditis Elegans*." *Aging Cell* 15 (2): 227–36. https://doi.org/10.1111/acel.12431.

Nash, Andrea K., Thomas A. Auchtung, Matthew C. Wong, Daniel P. Smith, Jonathan R. Gesell, Matthew C. Ross, Christopher J. Stewart, et al. 2017. "The Gut Mycobiome of the Human Microbiome Project Healthy Cohort." *Microbiome* 5 (1). BioMed Central: 153. https://doi.org/10.1186/s40168-017-0373-4.

Nathan, Sheila. 2014. "New to *Galleria Mellonella*: Modeling an ExPEC Infection." *Virulence* 5 (3): 371–74. https://doi.org/10.4161/viru.28338.

Neuhaus, Klaus, Marina C. Lamparter, Benjamin Zölch, Richard Landstorfer, Svenja Simon, Britta Spanier, Matthias A. Ehrmann, and Rudi F. Vogel. 2017. "Probiotic *Enterococcus Faecalis* Symbioflor® down Regulates Virulence Genes of EHEC *in Vitro* and Decrease Pathogenicity in a *Caenorhabditis Elegans* Model." *Archives of Microbiology* 199 (2). Springer Berlin Heidelberg: 203–13. https://doi.org/10.1007/s00203-016-1291-8.

Neumann-Haefelin, E., W. Qi, E. Finkbeiner, G. Walz, R. Baumeister, and M. Hertweck. 2008. "SHC-1/P52Shc Targets the Insulin/IGF-1 and JNK Signaling Pathways to Modulate Life Span and

Stress Response in *C. Elegans*." *Genes & Development* 22 (19): 2721–35. https://doi.org/10.1101/gad.478408.

Nicholas, Hannah R, and Jonathan Hodgkin. 2004. "The ERK MAP Kinase Cascade Mediates Tail Swelling and a Protective Response to Rectal Infection in *C. Elegans*." *Current Biology* 14 (14): 1256–61. https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.07.022.

Nishida, E, and Y Gotoh. 1993. "The MAP Kinase Cascade Is Essential for Diverse Signal Transduction Pathways." *Trends in Biochemical Sciences* 18 (4): 128–31. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8388132.

Nivoliez, Adrien. 2013. Utilisation de thiosulfate pour potentialiser l'effet anti-pathogène des lactobacilles. EP 2,869,825 B1, issued July 9, 2013. https://patents.google.com/patent/EP2869825B1.

Nivoliez, Adrien, Olivier Camares, Marylise Paquet-Gachinat, Stéphanie Bornes, Christiane Forestier, and Philippe Veisseire. 2012. "Influence of Manufacturing Processes on *in Vitro* Properties of the Probiotic Strain *Lactobacillus Rhamnosus* Lcr35®." *Journal of Biotechnology* 160 (3–4): 236–41. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.04.005.

Nivoliez, Adrien, Philippe Veisseire, Elina Alaterre, Caroline Dausset, Fabrice Baptiste, Olivier Camarès, Marylise Paquet-Gachinat, Muriel Bonnet, Christiane Forestier, and Stéphanie Bornes. 2015. "Influence of Manufacturing Processes on Cell Surface Properties of Probiotic Strain *Lactobacillus Rhamnosus* Lcr35®." *Applied Microbiology and Biotechnology* 99 (1): 399–411. https://doi.org/10.1007/s00253-014-6110-z.

Nobile, Clarissa J., Heather A. Schneider, Jeniel E. Nett, Donald C. Sheppard, Scott G. Filler, David R. Andes, and Aaron P. Mitchell. 2008. "Complementary Adhesin Function in *C. Albicans* Biofilm Formation." *Current Biology* 18 (14): 1017–24. https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.06.034.

Nugent, R P, M A Krohn, and S L Hillier. 1991. "Reliability of Diagnosing Bacterial Vaginosis Is Improved by a Standardized Method of Gram Stain Interpretation." *Journal of Clinical Microbiology* 29 (2): 297–301. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1706728.

Nyirjesy, Paul, Matthew J. McIntosh, David J. Gattermeir, Robert J. Schumacher, Jana I. Steinmetz, and James L. Joffrion. 2006. "The Effects of Intravaginal Clindamycin and Metronidazole Therapy on Vaginal Lactobacilli in Patients with Bacterial Vaginosis." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 194 (5): 1277–82. https://doi.org/10.1016/j.ajog.2005.11.006.

-O—

O'Callaghan, Amy, and Douwe van Sinderen. 2016. "Bifidobacteria and Their Role as Members of the Human Gut Microbiota." *Frontiers in Microbiology*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00925.

Ocaña, Virginia S, Añ-da A Pesce de Ruiz Holgado, and Marñ-a Elena Nader-Macñ-as. 1999. "Growth Inhibition of *Staphylococcus Aureus* by H2O2—Producing *Lactobacillus Paracasei* Subsp. *Paracasei* Isolated from the Human Vagina." *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 23 (2): 87–92. https://doi.org/10.1111/j.1574-695x.1999.tb01227.x.

Oh, S., G. W. Go, E. Mylonakis, and Y. Kim. 2012. "The Bacterial Signalling Molecule Indole Attenuates the Virulence of the Fungal Pathogen *Candida Albicans*." *Journal of Applied Microbiology* 113 (3): 622–28. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05372.x.

Oh, Seung Wook, Arnab Mukhopadhyay, Nenad Svrzikapa, Feng Jiang, Roger J Davis, and Heidi A Tissenbaum. 2005. "JNK Regulates Lifespan in *Caenorhabditis Elegans* by Modulating Nuclear Translocation of Forkhead Transcription Factor/DAF-16." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (12): 4494–99. https://doi.org/10.1073/pnas.0500749102.

Oikonomou, Grigorios, and Shai Shaham. 2011. "The Glia of *Caenorhabditis Elegans*." *Glia* 59 (9): 1253–63. https://doi.org/10.1002/glia.21084.

Okuyama, Tetsuya, Hideki Inoue, Sadatsugu Ookuma, Takayuki Satoh, Kei Kano, Sakiko Honjoh, Naoki Hisamoto, Kunihiro Matsumoto, and Eisuke Nishida. 2010. "The ERK-MAPK Pathway Regulates Longevity through SKN-1 and Insulin-like Signaling in *Caenorhabditis Elegans*." *Journal of Biological Chemistry* 285 (39): 30,274–81. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.146274.

Olier, Maïwenn, and Eric Oswald. 2012. "Un Probiotique Toxique Pour Les Cellules Intestinales. "

Presse Info, 2012.

Ottman, Noora, Hauke Smidt, Willem M. de Vos, and Clara Belzer. 2012. "The Function of Our Microbiota: Who Is out There and What Do They Do?" *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2: 104. https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00104.

-P—

Page, Antony P., and Iain L. Johnstone. 2007. "The Cuticle." *WormBook : The Online Review of C. Elegans Biology*. https://doi.org/doi/10.1895/wormbook.1.138.1.

Palese, Enzo, Maurizio Nudo, Grazia Zino, Valeria Devirgiliis, Mattia Carbotti, Eleonora Cinelli, Donatella Maria Rodio, et al. 2018. "Cutaneous Candidiasis Caused by *Candida Albicans* in a Young Non-Immunosuppressed Patient: An Unusual Presentation." *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 32 (March): 205,873,841,878,136. https://doi.org/10.1177/2058738418781368.

Palma, Mariana L, Daniel Zamith-Miranda, Flaviano S Martins, Fernando A Bozza, Leonardo Nimrichter, Mônica Montero-Lomeli, Ernesto T A Marques, and Bruno Douradinha. 2015. "Probiotic *Saccharomyces Cerevisiae* Strains as Biotherapeutic Tools: Is There Room for Improvement?" *Applied Microbiology and Biotechnology* 99 (16): 6563–70. https://doi.org/10.1007/s00253-015-6776-x.

Palmer, Chana, Elisabeth M Bik, Daniel B DiGiulio, David A Relman, and Patrick O Brown. 2007. "Development of the Human Infant Intestinal Microbiota." Edited by Yijun Ruan. *PLoS Biology* 5 (7). Public Library of Science: e177. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050177.

Papadimitriou, Konstantinos, Georgia Zoumpopoulou, Benoit Foligné, Voula Alexandraki, Maria Kazou, Bruno Pot, and Effie Tsakalidou. 2015. "Discovering Probiotic Microorganisms: *In Vitro*, *in Vivo*, Genetic and Omics Approaches." *Frontiers in Microbiology* 6 (FEB): 1–28. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00058.

Park, H-E H., Y. Jung, and S-J V. Lee. 2017. "Survival Assays Using *Caenorhabditis Elegans*." *Mol. Cells* 40 (2): 90–99. https://doi.org/10.14348/molcells.2017.0017.

Park, Hee-Kyung, Sung-Sub Shim, Su-Yung Kim, Jae-Hong Park, Su-Eun Park, Hak-Jung Kim, Byeong-Chul Kang, and Cheol-Min Kim. 2005. "Molecular Analysis of Colonized Bacteria in a Human Newborn Infant Gut." *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)* 43 (4): 345–53. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16145549.

Park, M R, H S Yun, S J Son, S Oh, and Y Kim. 2014. "Short Communication: Development of a Direct *in Vivo* Screening Model to Identify Potential Probiotic Bacteria Using *Caenorhabditis Elegans*." *Journal of Dairy Science* 97 (11): 6828–34. https://doi.org/10.3168/jds.2014-8561.

Park, Mi Ri, Sangdon Ryu, Brighton E Maburutse, Nam Su Oh, Sae Hun Kim, Sejong Oh, Seong Yeop Jeong, Do Youn Jeong, Sangnam Oh, and Younghoon Kim. 2018. "Probiotic *Lactobacillus Fermentum* Strain JDFM216 Stimulates the Longevity and Immune Response of *Caenorhabditis Elegans* through a Nuclear Hormone Receptor." *Scientific Reports* 8 (1): 7441. https://doi.org/10.1038/s41598-018-25333-8.

Pastuhov, Strahil Iv., Naoki Hisamoto, and Kunihiro Matsumoto. 2015. "MAP Kinase Cascades Regulating Axon Regeneration in C. Elegans." *Proceedings of the Japan Academy, Series B* 91 (3): 63–75. https://doi.org/10.2183/pjab.91.63.

Pees, Barbara, Wentao Yang, Alejandra Zárate-Potes, Hinrich Schulenburg, and Katja Dierking. 2016. "High Innate Immune Specificity through Diversified C-Type Lectin-Like Domain Proteins in Invertebrates." *Journal of Innate Immunity* 8 (2): 129–42. https://doi.org/10.1159/000441475.

Peterson, Nicholas D, Hilary K Cheesman, Pengpeng Liu, Sarah M Anderson, Kyle J Foster, Richa Chhaya, Paola Perrat, et al. 2019. "The Nuclear Hormone Receptor NHR-86 Controls Anti-Pathogen Responses in C. Elegans." *PLoS Genetics* 15 (1). Public Library of Science: e1007935. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007935.

Petricevic, L, and A Witt. 2008. "The Role of *Lactobacillus Casei Rhamnosus* Lcr35 in Restoring the Normal Vaginal Flora after Antibiotic Treatment of Bacterial Vaginosis." *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology* 115 (11): 1369–74. https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2008.01882.x.

Pinto, M., S. Robineleon, M.D. Appay, M Kedinger, N Triadou, E Dussaulx, B LACROIX, et al. 1983.

"Enterocyte-like Differentiation and Polarization of the Human Colon Carcinoma Cell Line Caco-2 in Culture." *Biology of the Cell* 47 (January): 323–30. https://doi.org/10.1007/s13539-011-0026-6.

Plaza-Díaz, Julio, Cándido Robles-Sánchez, Francisco Abadía-Molina, María José Sáez-Lara, Laura María Vilchez-Padial, Ángel Gil, Carolina Gómez-Llorente, and Luis Fontana. 2017. "Gene Expression Profiling in the Intestinal Mucosa of Obese Rats Administered Probiotic Bacteria." *Scientific Data* 4. Nature Publishing Group: 170186. https://doi.org/10.1038/sdata.2017.186.

Pokusaeva, Karina, Gerald F. Fitzgerald, and Douwe Van Sinderen. 2011. "Carbohydrate Metabolism in Bifidobacteria." *Genes and Nutrition* 6 (3): 285–306. https://doi.org/10.1007/s12263-010-0206-6.

Polak-Berecka, Magdalena, Adam Waśko, and Daniel Koston. 2010. "Comparison of Different Methods for Detection of Antimicrobial Activity of Probiotic Strains of *Lactobacillus Rhamnosus* against Some Food Spoilage Microorganisms." *Annales UMCS, Biologia* 64 (1) : 15–24. https://doi.org/10.2478/v10067-010-0002-0.

Portal-Celhay, Cynthia, Ellen R Bradley, and Martin J Blaser. 2012. "Control of Intestinal Bacterial Proliferation in Regulation of Lifespan in *Caenorhabditis Elegans*." *BMC Microbiology* 12 (1): 49. https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-49.

Poupet, Cyril, Taous Saraoui, Philippe Veisseire, Muriel Bonnet, Caroline Dausset, Marylise Gachinat, Olivier Camarès, Christophe Chassard, Adrien Nivoliez, and Stéphanie Bornes. 2019. "*Lactobacillus Rhamnosus* Lcr35 as an Effective Treatment for Preventing *Candida Albicans* Infection in the Invertebrate Model *Caenorhabditis Elegans*: First Mechanistic Insights." Edited by Ilse D. Jacobsen. *PLOS ONE* 14 (11). Public Library of Science: e0216184. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216184.

Poupet, Cyril, Philippe Veisseire, Muriel Bonnet, Olivier Camarès, Marylise Gachinat, Caroline Dausset, Christophe Chassard, Adrien Nivoliez, and Stéphanie Bornes. 2019. "Curative Treatment of Candidiasis by the Live Biotherapeutic Microorganism *Lactobacillus Rhamnosus* Lcr35® in the Invertebrate Model *Caenorhabditis Elegans*: First Mechanistic Insights." *Microorganisms 2020, Vol. 8, Page 34* 8 (1). Multidisciplinary Digital Publishing Institute: 34. https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8010034.

Pujol, Nathalie, Sophie Cypowyj, Katja Ziegler, Anne Millet, Aline Astrain, Alexandr Goncharov, Yishi Jin, Andrew D. Chisholm, and Jonathan J. Ewbank. 2008. "Distinct Innate Immune Responses to Infection and Wounding in the *C. Elegans* Epidermis." *Current Biology* 18 (7): 481–89. https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.02.079.

Pujol, Nathalie, Paul A. Davis, and Jonathan J. Ewbank. 2012. "The Origin and Function of Anti-Fungal Peptides in *C. Elegans*: Open Questions." *Frontiers in Immunology* 3 (August). Frontiers : 237. https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00237.

Pujol, Nathalie, Olivier Zugasti, Daniel Wong, Carole Couillault, C Lé Opold Kurz, Hinrich Schulenburg, and Jonathan J Ewbank. 2008. "Anti-Fungal Innate Immunity in *C. Elegans* Is Enhanced by Evolutionary Diversification of Antimicrobial Peptides." *PLoS Pathog* 4 (7). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000105.

Pukkila-Worley, Read, Frederick M. Ausubel, and Eleftherios Mylonakis. 2011. "*Candida Albicans* Infection of *Caenorhabditis Elegans* Induces Antifungal Immune Defenses." *PLoS Pathogens* 7 (6). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002074.

Pulikkan, Joby, Agnisrota Mazumder, and Tony Grace. 2019. "Role of the Gut Microbiome in Autism Spectrum Disorders." In *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1118:253—69. https://doi.org/10.1007/978-3-030-05542-4_13.

-Q—

Qi, Wenjing, Yijian Yan, Dietmar Pfeifer, Erika Donner v. Gromoff, Yimin Wang, Wolfgang Maier, and Ralf Baumeister. 2017. "*C. Elegans* DAF-16/FOXO Interacts with TGF-ß/BMP Signaling to Induce Germline Tumor Formation via MTORC1 Activation." Edited by Stuart K. Kim. *PLOS Genetics* 13 (5): e1006801. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006801.

Qin, Jiayang, Xiuwen Wang, Zhaojuan Zheng, Cuiqing Ma, Hongzhi Tang, and Ping Xu. 2010. "Production of L-Lactic Acid by a Thermophilic Bacillus Mutant Using Sodium Hydroxide as

Neutralizing Agent." *Bioresource Technology* 101 (19): 7570–76. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.037.

Qin, Junjie, Ruiqiang Li, Jeroen Raes, Manimozhiyan Arumugam, Kristoffer Solvsten Burgdorf, Chaysavanh Manichanh, Trine Nielsen, et al. 2010. "A Human Gut Microbial Gene Catalogue Established by Metagenomic Sequencing." *Nature* 464 (7285). Nature Publishing Group: 59–65. https://doi.org/10.1038/nature08821.

Quarella, Sara, Paola Lovrovich, Simone Scalabrin, Ilenia Campedelli, Ana Backovic, Veronica Gatto, Federica Cattonaro, Alessandro Turello, Sandra Torriani, and E Felis. 2016. "Draft Genome Sequence of the Probiotic Yeast *Kluyveromyces Marxianus Fragilis* B0399." *Genome Announc* 4 (5): 4–5. https://doi.org/10.1177/039463201402700318.8.

-R—

Raizen, David M., John E. Zimmerman, Matthew H. Maycock, Uyen D. Ta, Young Jai You, Meera V. Sundaram, and Allan I. Pack. 2008. "Lethargus Is a *Caenorhabditis Elegans* Sleep-like State." *Nature* 451 (7178): 569–72. https://doi.org/10.1038/nature06535.

Ramarao, Nalini, Christina Nielsen-Leroux, and Didier Lereclus. 2012. "The Insect *Galleria Mellonella* as a Powerful Infection Model to Investigate Bacterial Pathogenesis." *Journal of Visualized Experiments*, no. 70 (December): e4392. https://doi.org/10.3791/4392.

Ramon, A M, A Porta, and W A Fonzi. 1999. "Effect of Environmental PH on Morphological Development of *Candida Albicans* Is Mediated via the PacC-Related Transcription Factor Encoded by PRR2." *Journal of Bacteriology* 181 (24). American Society for Microbiology Journals: 7524–30. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10601210.

Rangan, Kavita J., Virginia A. Pedicord, Yen Chih Wang, Byungchul Kim, Yun Lu, Shai Shaham, Daniel Mucida, and Howard C. Hang. 2016. "A Secreted Bacterial Peptidoglycan Hydrolase Enhances Tolerance to Enteric Pathogens." *Science* 353 (6306) : 1434–37. https://doi.org/10.1126/science.aaf3552.

Rasamiravaka, Tsiry, Olivier M. Vandeputte, Laurent Pottier, Joelle Huet, Christian Rabemanantsoa, Martin Kiendrebeogo, Abel Andriantsimahavandy, et al. 2015. "*Pseudomonas Aeruginosa* Biofilm Formation and Persistence, along with the Production of Quorum Sensing-Dependent Virulence Factors, Are Disrupted by a Triterpenoid Coumarate Ester Isolated from *Dalbergia Trichocarpa*, a Tropical Legume." *PLoS ONE* 10 (7). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132791.

Ratsep, Merle. 2014. "Effect of *Lactobacillus Plantarum* Strains on Clinical Isolates of *Clostridium Difficile in Vitro*." *Journal of Probiotics & Health* 02 (01): 1–5. https://doi.org/10.4172/2329-8901.1000119.

Ravel, J., P. Gajer, Z. Abdo, G. M. Schneider, S. S. K. Koenig, S. L. McCulle, S. Karlebach, et al. 2011. "Vaginal Microbiome of Reproductive-Age Women." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (Supplement_1): 4680–87. https://doi.org/10.1073/pnas.1002611107.

Ravel, Jacques, Martin J Blaser, Jonathan Braun, Eric Brown, Frederic D Bushman, Eugene B Chang, Julian Davies, et al. 2014. "Human Microbiome Science: Vision for the Future, Bethesda, MD, July 24 to 26, 2013." *Microbiome* 2 (1). BioMed Central: 16. https://doi.org/10.1186/2049-2618-2-16.

Rawls, John F., Michael A. Mahowald, Ruth E. Ley, and Jeffrey I. Gordon. 2006. "Reciprocal Gut Microbiota Transplants from Zebrafish and Mice to Germ-Free Recipients Reveal Host Habitat Selection." *Cell* 127 (2): 423–33. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.043.

Reid, Gregor. 2001. "Probiotic Agents to Protect the Urogenital Tract against Infection." *The American Journal of Clinical Nutrition* 73 (2): 437s-443s. https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.437s.

Reid, Gregor, and Alan Bocking. 2003. "The Potential for Probiotics to Prevent Bacterial Vaginosis and Preterm Labor." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 189 (4): 1202–8. https://doi.org/10.1067/s0002-9378(03)00495-2.

Reid, Gregor, Jessica A. Younes, Henny C. Van der Mei, Gregory B. Gloor, Rob Knight, and Henk J. Busscher. 2011. "Microbiota Restoration: Natural and Supplemented Recovery of Human Microbial Communities." *Nature Reviews Microbiology* 9 (1): 27–38. https://doi.org/10.1038/nrmicro2473.

Richmond, Jon. 2000. "The 3Rs—Past, Present and Future." *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science* 27 (2): 84–92.

———. 2002. “Refinement, Reduction, and Replacement of Animal Use for Regulatory Testing: Future Improvements and Implementation within the Regulatory Framework.” *ILAR Journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources* 43 Suppl (1): S63—68. https://doi.org/10.1093/ilar.43.Suppl_1.S63.

Riddle, Donald L, Thomas Blumenthal, Barbara J Meyer, and James R Priess. 1997. “Section II Origins of the Model.” In *C. Elegans II.*, 2nd editio, 8:1948—50. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20127/.

Rijkers, Ger T., Stig Bengmark, Paul Enck, Dirk Haller, Udo Herz, Marko Kalliomaki, Satoshi Kudo, et al. 2010. “Guidance for Substantiating the Evidence for Beneficial Effects of Probiotics: Current Status and Recommendations for Future Research.” *The Journal of Nutrition* 140 (3): 671S-676S. https://doi.org/10.3945/jn.109.113779.

Roeder, Thomas, Mareike Stanisak, Christoph Gelhaus, Iris Bruchhaus, Joachim Grötzinger, and Matthias Leippe. 2010. “Caenopores Are Antimicrobial Peptides in the Nematode *Caenorhabditis Elegans* Instrumental in Nutrition and Immunity.” *Developmental & Comparative Immunology* 34 (2): 203–9. https://doi.org/10.1016/j.dci.2009.09.010.

Roeselers, Guus, Erika K Mittge, W Zac Stephens, David M Parichy, Colleen M Cavanaugh, Karen Guillemin, and John F Rawls. 2011. “Evidence for a Core Gut Microbiota in the Zebrafish.” *The ISME Journal* 5 (10): 1595–1608. https://doi.org/10.1038/ismej.2011.38.

Rousseau, Virginie. 2004. “Evaluation d’oligosaccharides à Effet Prébiotique Vis-à-Vis de La Microflore Vaginale.” Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse. http://eprint.insa-toulouse.fr/archive/00000069/.

Runeman, B, J Faergemann, O Larko, and Bo Runeman. 2000. “Experimental *Candida Albicans* Lesions in Healthy Humans: Dependence on Skin PH.” *Acta Dermato-Venereologica* 80 (6): 421–24. https://doi.org/10.1080/000155500300012819.

Russell, W.M.S, and R.L. Burch. 1959. *The Principles of Humane Experimental Technique*. Wheathampstead: London: Universities Federation for Animal Welfare. http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/het-toc.

-S-

Saarela, Maria, Gunnar Mogensen, Rangne Fondén, Jaana Mättö, and Tiina Mattila-Sandholm. 2000. “Probiotic Bacteria: Safety, Functional and Technological Properties.” *Journal of Biotechnology* 84: 197–215. www.elsevier.com/locate/jbiotec.

Salvetti, Elisa, Hugh M B Harris, Giovanna E Felis, and Paul W O’Toole. 2018. “Comparative Genomics of the Genus Lactobacillus Reveals Robust Phylogroups That Provide the Basis for Reclassification.” *Applied and Environmental Microbiology* 84 (17). American Society for Microbiology (ASM). https://doi.org/10.1128/AEM.00993-18.

Salvetti, Elisa, Sandra Torriani, and Giovanna E. Felis. 2012. “The Genus *Lactobacillus*: A Taxonomic Update.” *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 4 (4): 217–26. https://doi.org/10.1007/s12602-012-9117-8.

Santos, M A, and M F Tuite. 1995. “The CUG Codon Is Decoded *in Vivo* as Serine and Not Leucine in *Candida Albicans*.” *Nucleic Acids Research* 23 (9). Oxford University Press: 1481–86. https://doi.org/10.1093/nar/23.9.1481.

Sartor, R. Balfour. 2008. “Microbial Influences in Inflammatory Bowel Diseases.” *Gastroenterology* 134 (2). W.B. Saunders: 577–94. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.11.059.

Saville, Stephen P., Anna L. Lazzell, Carlos Monteagudo, and Jose L. Lopez-Ribot. 2003. “Engineered Control of Cell Morphology *In Vivo* Reveals Distinct Roles for Yeast and Filamentous Forms of *Candida Albicans* during Infection.” *Eukaryotic Cell* 2 (5): 1053–60. https://doi.org/10.1128/EC.2.5.1053-1060.2003.

Saxelin, Maija, Soile Tynkkynen, Tiina Mattila-Sandholm, and Willem M de Vos. 2005. “Probiotic and Other Functional Microbes: From Markets to Mechanisms.” *Current Opinion in Biotechnology* 16 (2): 204–11. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.02.003.

Scanlan, Leona D., Steven P. Lund, Sanem Hosbas Coskun, Shannon K. Hanna, Monique E. Johnson, Christopher M. Sims, Karina Brignoni, et al. 2018. “Counting *Caenorhabditis Elegans*: Protocol

Optimization and Applications for Population Growth and Toxicity Studies in Liquid Medium." *Scientific Reports* 8 (1). Nature Publishing Group: 904. https://doi.org/10.1038/s41598-018-19187-3.

Scanlan, Pauline D., Fergus Shanahan, Yvonne Clune, John K. Collins, Gerald C. O'Sullivan, Micheal O'Riordan, Elaine Holmes, Yulan Wang, and Julian R. Marchesi. 2008. "Culture-Independent Analysis of the Gut Microbiota in Colorectal Cancer and Polyposis." *Environmental Microbiology* 10 (3). John Wiley & Sons, Ltd (101,111): 789–98. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01503.x.

Schaller, Martin, Hans C. Korting, Wilhelm Schafer, Janine Bastert, WenChieh Chen, and Bernhard Hube. 1999. "Secreted Aspartic Proteinase (Sap) Activity Contributes to Tissue Damage in a Model of Human Oral Candidosis." *Molecular Microbiology* 34 (1): 169–80. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01590.x.

Schifano, Emily, Paola Zinno, Barbara Guantario, Marianna Roselli, Sante Marcoccia, Chiara Devirgiliis, and Daniela Uccelletti. 2019. "The Foodborne Strain *Lactobacillus Fermentum* MBC2 Triggers *Pept-1*-Dependent Pro-Longevity Effects in *Caenorhabditis Elegans*." *Microorganisms* 7 (2): 45. https://doi.org/10.3390/microorganisms7020045.

Schulenburg, Hinrich, and Claudia Boehnisch. 2008. "Diversification and Adaptive Sequence Evolution of *Caenorhabditis Lysozymes* (Nematoda: Rhabditidae)." *BMC Evolutionary Biology* 8 (1). BioMed Central: 114. https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-114.

Schulenburg, Hinrich, and Marie Anne Félix. 2017. "The Natural Biotic Environment of *Caenorhabditis Elegans*." *Genetics* 206 (1): 55–86. https://doi.org/10.1534/genetics.116.195511.

Sekirov, Inna, Shannon L. Russell, L. Caetano M. Antunes, and B. Brett Finlay. 2010. "Gut Microbiota in Health and Disease." *Physiological Reviews* 90 (3). American Physiological Society Bethesda, MD: 859–904. https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2009.

Semple, Jennifer I, Rosa Garcia-Verdugo, and Ben Lehner. 2010. "Rapid Selection of Transgenic *C. Elegans* Using Antibiotic Resistance." *Nature Methods* 7 (9): 725–27. https://doi.org/10.1038/nmeth.1495.

Sgibnev, Andrey V, and Elena A Kremleva. 2015. "Vaginal Protection by H2O2-Producing *Lactobacilli*." *Jundishapur Journal of Microbiology* 8 (10). Kowsar Medical Institute: e22913. https://doi.org/10.5812/jjm.22913.

Sha, Beverly E, Hua Y Chen, Qiong J Wang, M Reza Zariffard, Mardge H Cohen, and Gregory T Spear. 2005. "Utility of Amsel Criteria, Nugent Score, and Quantitative PCR for *Gardnerella Vaginalis*, *Mycoplasma Hominis*, and *Lactobacillus* Spp. for Diagnosis of Bacterial Vaginosis in Human Immunodeficiency Virus-Infected Women." *Journal of Clinical Microbiology* 43 (9). American Society for Microbiology Journals: 4607–12. https://doi.org/10.1128/JCM.43.9.4607-4612.2005.

Shah, Pranjul, Joëlle V. Fritz, Enrico Glaab, Mahesh S. Desai, Kacy Greenhalgh, Audrey Frachet, Magdalena Niegowska, et al. 2016. "A Microfluidics-Based *in Vitro* Model of the Gastrointestinal Human—Microbe Interface." *Nature Communications* 7 (1). Nature Publishing Group: 11,535. https://doi.org/10.1038/ncomms11535.

Sharika, Rajasekharan, Priya Subbaiah, and Krishnaswamy Balamurugan. 2018. "Studies on Reproductive Stress Caused by Candidate Gram Positive and Gram Negative Bacteria Using Model Organism, *Caenorhabditis Elegans*." *Gene* 649 (April). Elsevier: 113–26. https://doi.org/10.1016/J.GENE.2018.01.088.

Sharma, Kavita, Murugesan Pooranachithra, Krishnaswamy Balamurugan, and Gunjan Goel. 2018. "Multivariate Analysis of Increase in Life Span of *Caenorhabditis Elegans* Through Intestinal Colonization by Indigenous Probiotic Strains." *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, May 1, 2018. https://doi.org/10.1007/s12602-018-9420-0.

———. 2019. "Probiotic Mediated Colonization Resistance against *E.Coli* Infection in Experimentally Challenged *Caenorhabditis Elegans*." *Microbial Pathogenesis* 127 (February): 39–47. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.11.041.

Shipitsyna, Elena, Annika Roos, Raluca Datcu, Anders Hallén, Hans Fredlund, Jørgen S. Jensen, Lars Engstrand, and Magnus Unemo. 2013. "Composition of the Vaginal Microbiota in Women of Reproductive Age — Sensitive and Specific Molecular Diagnosis of Bacterial Vaginosis Is Possible?" Edited by Tom Coenye. *PLoS ONE* 8 (4). Public Library of Science: e60670. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060670.

Siciliano, Rosa Anna, and Maria Fiorella Mazzeo. 2012. "Molecular Mechanisms of Probiotic Action: A Proteomic Perspective." *Current Opinion in Microbiology* 15 (3). Elsevier Current Trends: 390–96. https://doi.org/10.1016/J.MIB.2012.03.006.

Silva, Sónia, Melyssa Negri, Mariana Henriques, Rosário Oliveira, David W. Williams, and Joana Azeredo. 2012. "*Candida Glabrata*, *Candida Parapsilosis* and *Candida Tropicalis*: Biology, Epidemiology, Pathogenicity and Antifungal Resistance." *FEMS Microbiology Reviews* 36 (2): 288–305. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x.

Sim, Insuk, Keun Tae Park, Gayeung Kwon, Jong Ho Koh, and Young Hee Lim. 2018. "Probiotic Potential of *Enterococcus Faecium* Isolated from Chicken Cecum with Immunomodulating Activity and Promoting Longevity in *Caenorhabditis Elegans*." *Journal of Microbiology and Biotechnology* 28 (6): 883–92. https://doi.org/10.4014/jmb.1802.02019.

Simoes, J A, A A Aroutcheva, S Shott, and S Faro. 2001. "Effect of Metronidazole on the Growth of Vaginal Lactobacilli *in Vitro*." *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology* 9 (1). Hindawi Limited: 41–45. https://doi.org/10.1155/S1064744901000072.

Smith, Michelle I., Tanya Yatsunenko, Mark J. Manary, Indi Trehan, Rajhab Mkakosya, Jiye Cheng, Andrew L. Kau, et al. 2013. "Gut Microbiomes of Malawian Twin Pairs Discordant for Kwashiorkor." *Science* 339 (6119): 548–54. https://doi.org/10.1126/science.1229000.

Sobel, Jack D. 2003. "Management of Patients with Recurrent Vulvovaginal Candidiasis." *Drugs* 63 (11): 1059–66. https://doi.org/10.2165/00003495-200363110-00002.

———. 2007. "Vulvovaginal Candidosis." *The Lancet* 369 (9577): 1961–71. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60917-9.

Sobhani, Iradj, Julien Tap, Françoise Roudot-Thoraval, Jean P. Roperch, Sophie Letulle, Philippe Langella, Gérard Corthier, Jeanne Tran Van Nhieu, and Jean P. Furet. 2011. "Microbial Dysbiosis in Colorectal Cancer (CRC) Patients." Edited by Sylviane Pied. *PLoS ONE* 6 (1): e16393. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016393.

Sokol, H., B. Pigneur, L. Watterlot, O. Lakhdari, L. G. Bermudez-Humaran, J.-J. Gratadoux, S. Blugeon, et al. 2008. "*Faecalibacterium Prausnitzii* Is an Anti-Inflammatory Commensal Bacterium Identified by Gut Microbiota Analysis of Crohn Disease Patients." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (43): 16,731–36. https://doi.org/10.1073/pnas.0804812105.

Spor, Aymé, Omry Koren, and Ruth Ley. 2011. "Unravelling the Effects of the Environment and Host Genotype on the Gut Microbiome." *Nature Reviews Microbiology* 9 (4): 279–90. https://doi.org/10.1038/nrmicro2540.

Staab, J F, S D Bradway, P L Fidel, and P Sundstrom. 1999. "Adhesive and Mammalian Transglutaminase Substrate Properties of *Candida Albicans* Hwp1." *Science (New York, N.Y.)* 283 (5407). American Association for the Advancement of Science: 1535–38. https://doi.org/10.1126/science.283.5407.1535.

Strati, Francesco, Monica Di Paola, Irene Stefanini, Davide Albanese, Lisa Rizzetto, Paolo Lionetti, Antonio Calabrò, et al. 2016. "Age and Gender Affect the Composition of Fungal Population of the Human Gastrointestinal Tract." *Frontiers in Microbiology* 7 (August). Frontiers : 1227. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01227.

Styer, K. L., V. Singh, E. Macosko, S. E. Steele, C. I. Bargmann, and A. Aballay. 2008. "Innate Immunity in *Caenorhabditis Elegans* Is Regulated by Neurons Expressing NPR-1/GPCR." *Science* 322 (5900): 460–64. https://doi.org/10.1126/science.1163673.

Sugawara, Takaya, and Kazuichi Sakamoto. 2018. "Killed *Bifidobacterium Longum* Enhanced Stress Tolerance and Prolonged Life Span of *Caenorhabditis Elegans* via DAF-16." *British Journal of Nutrition* 120 (8): 872–80. https://doi.org/10.1017/S0007114518001563.

Sun, Lingmei, Lingtong Zhi, Shumaila Shakoor, Kai Liao, and Dayong Wang. 2016. "MicroRNAs Involved in the Control of Innate Immunity in *Candida* Infected *Caenorhabditis Elegans*." *Scientific Reports* 6 (October). Nature Publishing Group: 36,036. https://doi.org/10.1038/srep36036.

Sundstrom, Paula. 2002. "Adhesion in *Candida* Spp." *Cellular Microbiology* 4 (8): 461–69. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12174081.

Šušković, Jagoda, Blaženka Kos, Jasna Beganović, Andreja Leboš Pavunc, Ksenija Habjanič, and

Srećko Matoć. 2010. “Antimicrobial Activity—The Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria.” *Food Technology and Biotechnology* 48 (3): 296–307.

Swanson, P. A., A. Kumar, S. Samarin, M. Vijay-Kumar, K. Kundu, N. Murthy, J. Hansen, A. Nusrat, and A. S. Neish. 2011. “Enteric Commensal Bacteria Potentiate Epithelial Restitution via Reactive Oxygen Species-Mediated Inactivation of Focal Adhesion Kinase Phosphatases.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (21): 8803–8. https://doi.org/10.1073/pnas.1010042108.

Sweeney, Timothy E, and John M Morton. 2013. “The Human Gut Microbiome: A Review of the Effect of Obesity and Surgically Induced Weight Loss.” *JAMA Surgery* 148 (6). NIH Public Access: 563–69. https://doi.org/10.1001/jamasurg.2013.5.

-T—

Tachedjian, Gilda, Muriel Aldunate, Catronia S. Bradshaw, and Richard A. Cone. 2017. “The Role of Lactic Acid Production by Probiotic *Lactobacillus* Species in Vaginal Health.” *Research in Microbiology* 168 (9–10). Elsevier Masson: 782–92. https://doi.org/10.1016/J.RESMIC.2017.04.001.

Tan, Hongying, Yunque Fu, Chunlin Yang, and Jianting Ma. 2017. “Effects of Metronidazole Combined Probiotics over Metronidazole Alone for the Treatment of Bacterial Vaginosis: A Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials.” *Archives of Gynecology and Obstetrics* 295 (6): 1331–39. https://doi.org/10.1007/s00404-017-4366-0.

Tan, M W, S Mahajan-Miklos, and F M Ausubel. 1999. “Killing of *Caenorhabditis Elegans* by *Pseudomonas Aeruginosa* Used to Model Mammalian Bacterial Pathogenesis.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (2): 715–20. https://doi.org/10.1073/pnas.96.2.715.

Tan, M W, L G Rahme, J A Sternberg, R G Tompkins, and F M Ausubel. 1999. “*Pseudomonas Aeruginosa* Killing of *Caenorhabditis Elegans* Used to Identify *P. Aeruginosa* Virulence Factors.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (5): 2408–13. https://doi.org/10.1073/pnas.96.5.2408.

Taylor, Brad N, Holger Hannemann, Miriam Sehnal, Antje Biesemeier, Anja Schweizer, Martin Röllinghoff, and Klaus Schröppel. 2005. “Induction of SAP7 Correlates with Virulence in an Intravenous Infection Model of Candidiasis but Not in a Vaginal Infection Model in Mice.” *Infection and Immunity* 73 (10). American Society for Microbiology Journals: 7061–63. https://doi.org/10.1128/IAI.73.10.7061-7063.2005.

Thakur, Nishchal, Namita Rokana, and Harsh Panwar. 2016. “Probiotics: Selection Criteria, Safety and Role in Health and Disease” 3 (1): 259–70.

Tharmaraj, N., and N. P. Shah. 2009. “Antimicrobial Effects of Probiotics against Selected Pathogenic and Spoilage Bacteria in Cheese-Based Dips.” *International Food Research Journal* 16 (3): 261–76.

The C. elegans Sequencing Consortium. 1998. “Genome Sequence of the Nematode *C. Elegans*: A Platform for Investigating Biology.” *Science* 282 (5396). American Association for the Advancement of Science: 2012–18. https://doi.org/10.1126/science.282.5396.2012.

Thoma, Marie E, Mark A Klebanoff, Alisha J Rovner, Tonja R Nansel, Yasmin Neggers, William W Andrews, and Jane R Schwebke. 2011. “Bacterial Vaginosis Is Associated with Variation in Dietary Indices.” *The Journal of Nutrition* 141 (9). American Society for Nutrition: 1698–1704. https://doi.org/10.3945/jn.111.140541.

Thursby, Elizabeth, and Nathalie Juge. 2017. “Introduction to the Human Gut Microbiota.” *The Biochemical Journal* 474 (11). Portland Press Ltd: 1823–36. https://doi.org/10.1042/BCJ20160510.

Tong, Chang, Ping Li, Nancy L. Wu, Youzhen Yan, and Qi-Long Ying. 2010. “Production of P53 Gene Knockout Rats by Homologous Recombination in Embryonic Stem Cells.” *Nature* 467 (7312): 211–13. https://doi.org/10.1038/nature09368.

Torcia, Maria Gabriella. 2019. “Interplay among Vaginal Microbiome, Immune Response and Sexually Transmitted Viral Infections.” *International Journal of Molecular Sciences* 20 (2). https://doi.org/10.3390/ijms20020266.

Tournier, C, C Dong, T K Turner, S N Jones, R A Flavell, and R J Davis. 2001. “MKK7 Is an Essential

Component of the JNK Signal Transduction Pathway Activated by Proinflammatory Cytokines." *Genes & Development* 15 (11). Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1419–26. https://doi.org/10.1101/gad.888501.

Trinder, Mark, Brendan A. Daisley, Josh S. Dube, and Gregor Reid. 2017. "*Drosophila Melanogaster* as a High-Throughput Model for Host-Microbiota Interactions." *Frontiers in Microbiology* 8 (APR): 1–8. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00751.

Troemel, Emily R, Stephanie W Chu, Valerie Reinke, Siu Sylvia Lee, Frederick M Ausubel, and Dennis H Kim. 2006. "P38 MAPK Regulates Expression of Immune Response Genes and Contributes to Longevity in *C. Elegans*." *PLoS Genetics* 2 (11): 1725–39. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020183.

Turnbaugh, Peter J., and Jeffrey I. Gordon. 2009. "The Core Gut Microbiome, Energy Balance and Obesity." *The Journal of Physiology* 587 (17): 4153–58. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.174136.

-U—

Upadrasta, Aditya, Catherine Stanton, Colin Hill, Gerald F. Fitzgerald, and R. Paul Ross. 2011. "Improving the Stress Tolerance of Probiotic Cultures: Recent Trends and Future Directions." In *Stress Responses of Lactic Acid Bacteria*, 395–438. Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-0-387-92771-8_17.

-V—

Verhulst, Stijn L., Carl Vael, Caroline Beunckens, Vera Nelen, Herman Goossens, and Kristine Desager. 2008. "A Longitudinal Analysis on the Association Between Antibiotic Use, Intestinal Microflora, and Wheezing During the First Year of Life." *Journal of Asthma* 45 (9). Taylor & Francis: 828–32. https://doi.org/10.1080/02770900802339734.

Verstrepen, Kevin J., and Frans M. Klis. 2006. "Flocculation, Adhesion and Biofilm Formation in Yeasts." *Molecular Microbiology* 60 (1). John Wiley & Sons, Ltd (101,111): 5–15. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05072.x.

Vijay-Kumar, M., J. D. Aitken, F. A. Carvalho, T. C. Cullender, S. Mwangi, S. Srinivasan, S. V. Sitaraman, R. Knight, R. E. Ley, and A. T. Gewirtz. 2010. "Metabolic Syndrome and Altered Gut Microbiota in Mice Lacking Toll-Like Receptor 5." *Science* 328 (5975): 228–31. https://doi.org/10.1126/science.1179721.

Vilela, Simone FG, Júnia O Barbosa, Rodnei D Rossoni, Jéssica D Santos, Marcia CA Prata, Ana Lia Anbinder, Antonio OC Jorge, and Juliana C Junqueira. 2015. "*Lactobacillus Acidophilus* ATCC 4356 Inhibits Biofilm Formation by *C. Albicans* and Attenuates the Experimental Candidiasis in *Galleria Mellonella*." *Virulence* 6 (1). Taylor & Francis: 29–39. https://doi.org/10.4161/21505594.2014.981486.

Visvikis, Orane, Nnamdi Ihuegbu, Sid A. Labed, Lyly G. Luhachack, Anna Maria F Alves, Amanda C. Wollenberg, Lynda M. Stuart, Gary D. Stormo, and Javier E. Irazoqui. 2014. "Innate Host Defense Requires TFEB-Mediated Transcription of Cytoprotective and Antimicrobial Genes." *Immunity* 40 (6). Elsevier Inc.: 896–909. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.05.002.

Vos, Willem M. de, and Elisabeth A J De Vos. 2012. "Role of the Intestinal Microbiome in Health and Disease: From Correlation to Causation." *Nutrition Reviews* 70 (SUPPL. 1). https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00505.x.

-W—

Wada, T, K Nakagawa, T Watanabe, G Nishitai, J Seo, H Kishimoto, D Kitagawa, et al. 2001. "Impaired Synergistic Activation of Stress-Activated Protein Kinase SAPK/JNK in Mouse Embryonic Stem Cells Lacking SEK1/MKK4: Different Contribution of SEK2/MKK7 Isoforms to the Synergistic Activation." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (33). American Society for Biochemistry and Molecular Biology: 30,892–97. https://doi.org/10.1074/jbc.M011780200.

Wan, Liting, Jian Lin, Hongwen Du, Yulan Zhang, Alejandra Bravo, Mario Soberón, Ming Sun, and Donghai Peng. 2019. "*Bacillus Thuringiensis* Targets the Host Intestinal Epithelial Junctions for Successful Infection of *Caenorhabditis Elegans*." *Environmental Microbiology* 21 (3). John Wiley

& Sons, Ltd (101,111): 1086–98. https://doi.org/10.1111/1462-2920.14528.

Wang, Baohong, Mingfei Yao, Longxian Lv, Zongxin Ling, and Lanjuan Li. 2017. "The Human Microbiota in Health and Disease." *Engineering*. https://doi.org/10.1016/J.ENG.2017.01.008.

Ward, S, and J S Carrel. 1979. "Fertilization and Sperm Competition in the Nematode *Caenorhabditis Elegans*." *Developmental Biology* 73 (2): 304–21. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/499670.

Weiss, James E, and Leo F Rettger. 1934. "*Lactobacillus Bifidus*." *Journal of Bacteriology* 28 (5): 501–21.

Wen, Li, Ruth E. Ley, Pavel Yu. Volchkov, Peter B. Stranges, Lia Avanesyan, Austin C. Stonebraker, Changyun Hu, et al. 2008. "Innate Immunity and Intestinal Microbiota in the Development of Type 1 Diabetes." *Nature* 455 (7216). Nature Publishing Group: 1109–13. https://doi.org/10.1038/nature07336.

White, Corin V., and Michael A. Herman. 2018. "Transcriptomic, Functional, and Network Analyses Reveal Novel Genes Involved in the Interaction Between *Caenorhabditis Elegans* and *Stenotrophomonas Maltophilia*." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 8 (August): 266. https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00266.

Williams, Paul. 2007. "Quorum Sensing, Communication and Cross-Kingdom Signalling in the Bacterial World." *Microbiology* 153 (12): 3923–38. https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/012856-0.

Wolf, Marc, Frank Nunes, Arne Henkel, Alexander Heinick, and Rüdiger J. Paul. 2008. "The MAP Kinase JNK-1 of *Caenorhabditis Elegans*: Location, Activation, and Influences over Temperature-Dependent Insulin-like Signaling, Stress Responses, and Fitness." *Journal of Cellular Physiology* 214 (3). John Wiley & Sons, Ltd: 721–29. https://doi.org/10.1002/jcp.21269.

World Gastroenterology Organisation. 2015. "Syndrome de l ' Intestin Irritable : Une Approche Globale. " *World Gastroenterology Organisation Global Guidelines Syndrome*, 1–26.

World Health Organization. 2009. "Guidelines on Evaluation of Similar Biotherapeutic Products (SBPs)." *WHO Technical Report Series*, no. October: 34.

Wormbase. 2011. "Daf-2 (Gene)." 2011. http://www.wormbase.org/species/c_elegans/gene/WBGene00000898#0-9g-3.

———. 2015. "Daf-16 (Gene)." 2015. http://www.wormbase.org/species/c_elegans/gene/WBGene00000912#0e-9g-3.

-X—

Xie, Huan Yu, Dan Feng, Dong Mei Wei, Ling Mei, Hui Chen, Xun Wang, and Fang Fang. 2017. "Probiotics for Vulvovaginal Candidiasis in Non-Pregnant Women." *Cochrane Database of Systematic Reviews* 11 (November): CD010496. https://doi.org/10.1002/14651858.CD010496.pub2.

Xu, Ajing, Guojun Shi, Feng Liu, and Baoxue Ge. 2013. "*Caenorhabditis Elegans* Mom-4 Is Required for the Activation of the P38 MAPK Signaling Pathway in the Response to *Pseudomonas Aeruginosa* Infection." *Protein & Cell* 4 (1): 53–61. https://doi.org/10.1007/s13238-012-2080-z.

-Y-

Yang, Wentao, Katja Dierking, Daniela Esser, Andreas Tholey, Matthias Leippe, Philip Rosenstiel, and Hinrich Schulenburg. 2015. "Overlapping and Unique Signatures in the Proteomic and Transcriptomic Responses of the Nematode *Caenorhabditis Elegans* toward Pathogenic *Bacillus Thuringiensis*." *Developmental and Comparative Immunology* 51 (1): 1–9. https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.02.010.

Yang, Wentao, Katja Dierking, and Hinrich Schulenburg. 2016. "WormExp: A Web-Based Application for a *Caenorhabditis Elegans*—Specific Gene Expression Enrichment Analysis." *Bioinformatics* 32 (6). Narnia: 943–45. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv667.

Yera, H., B. Sendid, N. Francois, D. Camus, and D. Poulain. 2001. "Contribution of Serological Tests and Blood Culture to the Early Diagnosis of Systemic Candidiasis." *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 20 (12). Springer-Verlag: 864–70. https://doi.org/10.1007/s100960100629.

Younes, Jessica A., Henny C. van der Mei, Edwin van den Heuvel, Henk J. Busscher, and Gregor Reid. 2012. "Adhesion Forces and Coaggregation between Vaginal Staphylococci and Lactobacilli."

PLoS ONE 7 (5). Public Library of Science. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036917.

Young, Vincent B. 2017. "The Role of the Microbiome in Human Health and Disease: An Introduction for Clinicians." *BMJ (Online)*. British Medical Journal Publishing Group. https://doi.org/10.1136/bmj.j831.

-Z-

Zanni, Elena, Chiara Laudenzi, Emily Schifano, Claudio Palleschi, Giuditta Perozzi, Daniela Uccelletti, and Chiara Devirgiliis. 2015. "Impact of a Complex Food Microbiota on Energy Metabolism in the Model Organism *Caenorhabditis Elegans*." *BioMed Research International* 2015. https://doi.org/10.1155/2015/621709.

Zarkower, David. 2006. "Somatic Sex Determination." *WormBook*, 1–12. https://doi.org/10.1895/wormbook.1.84.1.

Zhao, Liang, Yang Zhao, Ruihai Liu, Xiaonan Zheng, Min Zhang, Huiyuan Guo, Hao Zhang, and Fazheng Ren. 2017. "The Transcription Factor DAF-16 Is Essential for Increased Longevity in *C. Elegans* Exposed to *Bifidobacterium Longum* BB68." *Scientific Reports* 7 (1). Springer US: 7408. https://doi.org/10.1038/s41598-017-07974-3.

Zheng, H.-Y., T. M. Alcorn, and M. S. Cohen. 1994. "Effects Of H2O2-Producing Lactobacilli On *Neisseria Gonorrhoeae* Growth and Activity." *Journal of Infectious Diseases* 170 (5): 1209–15. https://doi.org/10.1093/infdis/170.5.1209.

Zhou, Mengzhou, Xiaozhen Liu, Hai Yu, Xianhua Yin, Shao-Ping Nie, Ming-Yong Xie, Wei Chen, and Joshua Gong. 2018. "Cell Signaling of *Caenorhabditis Elegans* in Response to Enterotoxigenic *Escherichia Coli* Infection and *Lactobacillus Zeae* Protection." *Frontiers in Immunology* 9. Frontiers Media SA : 1745. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01745.

Zhou, Mengzhou, Hai Yu, Xianhua Yin, Parviz M. Sabour, Wei Chen, and Joshua Gong. 2014. "*Lactobacillus Zeae* Protects *Caenorhabditis Elegans* from Enterotoxigenic *Escherichia Coli*-Caused Death by Inhibiting Enterotoxin Gene Expression of the Pathogen." *PLoS ONE* 9 (2). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089004.

Zoetendal, Erwin G., Antoon D. L. Akkermans, and Willem M. De Vos. 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). American Society for Microbiology (ASM): 3854. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC106569/.

Zou, C.-G., Y.-C. Ma, L.-L. Dai, and K.-Q. Zhang. 2014. "Autophagy Protects *C. Elegans* against Necrosis during *Pseudomonas Aeruginosa* Infection." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (34): 12,480–85. https://doi.org/10.1073/pnas.1405032111.

Zugasti, Olivier, and Jonathan J Ewbank. 2009. "Neuroimmune Regulation of Antimicrobial Peptide Expression by a Noncanonical TGF-β Signaling Pathway in *Caenorhabditis Elegans* Epidermis." *Nature Immunology* 10 (3): 249–56. https://doi.org/10.1038/ni.1700.

Annexes

Annexe 1. Article de revue bibliographique 265

Annexe 2. Composition des milieux de culture 289

Annexe 3. Construction bioinformatique des amorces pour le suivi par RT-PCR quantitative de l'expression de genes 291

Annexe 4. Script RMarkdown pour l'analyse des donnees de survie 297

Annexe 1. Article de revue bibliographique

***Caenorhabditis elegans*, a host investigate the probiotic properties of beneficial microorganisms**

Cyril Poupet, Christophe Chassard, Adrien Nivoliez and Stéphanie Bornes

Soumis dans Frontiers in Nutrition, en révision

frontiers

Caenorhabditis elegans, a host to investigate the probiotic properties of beneficial microorganisms

Cyril Poupet[1*†], Christophe Chassard[1], Adrien Nivoliez[2], Stéphanie Bornes[1†]

[1]Université Clermont Auvergne, INRAE, VetAgro Sup, UMRF, Aurillac, France

[2]Biose Industrie, Aurillac, France

[†] These authors contributed equally to this work.

*** Correspondence:**
Cyril Poupet
cyril.poupet@gmail.com

Keywords: *Caenorhabditis elegans*, probiotics, lifespan, pathogens, stress response, immunity

Abstract

Caenorhabditis elegans, a non-parasitic nematode emerges as a relevant and powerful candidate as an *in vivo* model for microorganisms-microorganisms and microorganisms-host interactions studies. Experiments have demonstrated the probiotic potential of bacteria since they can provide to the worm a longer lifespan, an increased resistance to pathogens and to oxidative or heat stresses. Probiotics are used to prevent or treat microbiota dysbiosis and associated pathologies but the molecular mechanisms underlying their capacities are still unknown. Beyond safety and healthy aspects of probiotics, *C. elegans* represents a powerful way to design large-scale studies to explore transkingdom interactions and to solve questioning about the molecular aspect of these interactions. Future challenges and opportunities would be to validate *C. elegans* as an *in vivo* tool for high-throughput screening of microorganisms for their potential probiotic use on human health and to enlarge the panels of microorganisms studied as well as the human diseases investigated.

Four figures
2 tables
11846 words

1 Introduction

With the advent of probiotic microorganisms, including lactic acid producing bacteria (LAB), in the treatment of diseases related to dysbiosis, there is the question of understanding the mechanisms of action of these strains. How to efficiently screen microorganisms' collections to select new probiotics for innovative therapeutics applications is an emerging question as well.

Probiotics have been officially defined in 2001 by both the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and the World Health Organization (WHO) as "live microorganisms which, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host" (1). A new name is increasingly used to replace the term probiotic: live biotherapeutic products (LBP). These LBP are biological products containing live biotherapeutic microorganisms (LBM) used to prevent, treat or cure a disease or condition of human beings, excluding vaccines (2). Under this appellation, a wide variety of microbial species is found within both prokaryotes and eukaryotes (yeasts) although there are mainly lactic bacteria such as *Lactobacillus* strains.

In general, the mechanisms of action of probiotic species are poorly characterized and often based on empirical data as survival studies in the gut or immunomodulation (3,4). At present, selection of new probiotic strains is based on a series of tests both *in vitro* and *in vivo*. The main *in vitro* tests commonly used are: the tolerance to acidity and gastric enzymes, the tolerance to bile and intestinal enzymes, the adhesion to intestinal cells and the persistence in the digestive tract, and the lack of pathogenic behavior (5). *In vitro* tests are informative but complementary *in vivo* approaches is mandatory for a better characterization of probiotics mechanism of action but also safety aspects.

The selection of new microbial strains with probiotic potential as well as the characterization of their properties have been based on experiments using *in vitro* models (cell cultures). These have an undeniable advantage: strict control of the experimental conditions (e.g. nature of the culture media, quantity of microorganisms, temperature, pH, etc.) as well as interactions between a limited number of microorganisms, most often using binary models. This facilitates the analysis and interpretation of the observed effects. However, the experimental conditions are particularly distant from the complex conditions found in a host. In addition, research into probiotic microorganisms is facing new challenges with increasing regulatory pressure from the European Union and the United States of America. These regulatory obstacles impose on pharmaceutical laboratories manufacturing probiotics and therefore on research teams, the use of relevant methods and models to study probiotic strains, by combining *in vitro* and *in vivo* approaches. It is only with this finer characterization that the laboratories will be able to justify more firmly the interest of using their products for health applications (6). However, in the same way as for *in vitro* models, depending on the scientific (historical) context and the objective to be achieved, it will be advisable to select the most pertinent model before the final essential study which is to carry out clinical trials in humans (7). Regarding to *in vivo* tests, many studies involve laboratory animals (*e.g.* rats, mice, rabbits, or guinea pigs) or clinical trials on the human population for the last stages of research. These clinical trials, although very important to determine the effectiveness of the strain and the potential harmful effects, are particularly expensive, time-consuming and difficult to implement (8). There is a need for *in vivo* alternatives, easier to handle but sufficiently close to humans for the *in vivo* and large-scale probiotic studies. In any case, the thorough study of gut microbiota remains difficult and requires a lot of steps combining *in vitro* studies, tests on laboratory animals and finally on humans (9).

The current number of *in vivo* methods for fast and reliable analysis of collections using complex multicellular models is too limited. Mainly for cost reasons, infrastructure and ethics, it is definitely not possible anymore to use quantities of laboratory animals such as mice or rats during the early stages of research (10,11). For over 30 years, at least 4000 researchers around the world have turned to *Caenorhabditis elegans* in fields such as ecotoxicology, neurobiology, degenerative disease, aging, host-microorganism interactions and recently virus-host interactions (12–14). *C. elegans*, which was

This is a provisional file, not the final typeset article

described for the first time in 1900 by Maupass (15), was introduced into laboratories in the late 1960s by Sidney Brenner who made it a model in genetics. His work, which won him the Nobel Prize in Medicine in 2002, allowed a detailed understanding of the molecular mechanisms of the regulation of gene expression, cell polarity, apoptosis, organogenesis and aging (16,17). *C. elegans* is a 1 mm long worm, living in the soil and usually feeding on bacteria. It is a self-fertilizing hermaphrodite nematode with many laboratory advantages. Among these advantages are the simple growth conditions, a short generation time (18), a transparent body facilitating fluorescence microscopy observation, the ability for genetic engineering and a low cost of use. Thanks to its sensory neurons allowing it to detect different chemical signatures, it is able to select its food and at the same time avoid pathogenic microorganisms (19). The generation of one million mutants obtained in a few weeks will be contained in 20 Petri dishes at a cost equivalent to that of a single mouse (20). Considering the morphological aspect of the animal, its intestine is a major organ with one third of the total somatic mass (21). The morphology of intestinal cells as well as the phenomena of endocytosis and exocytosis display similarities with humans (22). The 97 Mbp worm's genome is fully sequenced (23) and contains 19,099 genes, almost as much as the human genome. Seventy-four percent of human proteins have homologues in the model organism *C. elegans* (24). This sequence and annotation knowledge allowed the generation by the *Caenorhabditis* Genetic Center (CGC) of more than 12,000 different strains (wild, mutants), all genetically characterized, facilitating the mechanistic research using the nematode. Key genes regulating in a global way the metabolism and the life expectancy of *C. elegans* such as the *daf-2* and *daf-16* genes, respectively encoding for an insulin receptor and for a Forkhead box O (FOXO) transcription factor, were identified. They are involved in the expression of genes encoding chaperone, antioxidant or antimicrobial proteins via the Insulin/IGF-1 mediated signaling pathway (IIS), all leading to the modulation of the worm's health condition and consequently of its lifetime (25–27).

Several antimicrobial pathways found in mammals are also found in the worms suggesting it is a powerful model to explore immunological mechanisms (28,29). Finally, since the first infection model involving *Pseudomonas aeruginosa* in 1999 (30,31), a lot of studies reported the susceptibility of the worm to numerous bacterial and fungal pathogens, some of them infecting humans such as *Pseudomonas aeruginosa* (32), *Enterococcus faecalis* (33), *Staphylococcus aureus, Salmonella, Escherichia coli* O157:H7 or *Klebsiella pneumoniae* (34–37). Considering all these points, *C. elegans* could be a relevant go-between host model between *in vitro* and mammalian models for the investigation of host-microorganism interactions at the molecular level using direct genetic and mechanistic approaches.

This review is focused on studies using *C. elegans* to investigate its interaction with lactic acid bacteria having evidenced probiotic capacities. The pertinence and the advantages of using *C. elegans* as a model organism to identify new potentially probiotic strains are analyzed. The new way to use the worm, with the aim to screen microorganisms' collections for specific probiotic characters, is also detailed in the manuscript. This manuscript was written from an exhaustive review of the scientific literature related to the *C. elegans* model and the *in vivo* characterization of microbial strain with probiotic potential. All recent articles have been considered without distinction and studied objectively to avoid bias. The compilation of bibliographic data, from the PubMed database, was carried out in three stages. The first, relating to the comparison of experimental models, was done using the keywords experimental models, *in vivo*, comparison, mice, rat, zebrafish, *C. elegans*, *Drosophila melanogaster* and *Galleria mellonella*. The second, in connection with the use of the *C. elegans* model as the study of probiotics, required the following key words *C. elegans*, probiotic, live biotherapeutic microorganism, mechanisms, immunity, and pathway. Finally, for the third step, the keywords *C. elegans*, high-throughput, translational, and prospects were used. In all three cases, the logical operator "AND" was used.

Fifty-two publications focused on *C. elegans* and probiotics are referenced in PubMed database, 19 out of 48 have been published from 2018, 11 of whom in 2019 and already 11 in 2020, confirming the emergence of this model in this research domain.

2 *C. elegans* model advantages and limitations compared to other *in vivo* models

2.1 Is-*C. elegans* a better model than *in vitro* model?

The use of *in vivo* techniques to explore the world of probiotics has made it possible to describe a large variety of models with very varied complexities. These can be as simple as multicellular organisms like worms, flies (invertebrates) as well as being particularly sophisticated like knockout mice or humans (clinical trials). All these models provide the scientific community with a very large amount of information, but they also have certain drawbacks. Consequently, it is essential to choose with discernment and rigor the model which will be the most adapted to the scientific question based on technical, ethical, economic aspects and according to scientific context. Therefore, while the characterization and evaluation of the properties of a probiotic strain should be carried out directly within the target population, a preselection of the strains is essential before testing it using appropriate *in vivo* models (6,38). Two kinds of models are commonly used, the vertebrate and the invertebrate organisms. The table 1 lists the advantages and the limitations of the most commonly used models in the context of probiotics characterization but among the limits of their use are ethics and legislation.

2.2 Vertebrate models

The scientific community now has vertebrate animal models allowing investigations in most fields of biology. The best known are the rat (*Rattus norvegicus*), the mouse (*Mus musculus*), the zebrafish (*Danio rerio*) the guinea pig (*Cavia porcellus*), the macaque (*Macaca mulatta*), the cat (*Felis sylvestris catus*) or the dog (*Canis lupus familiaris*) to name a few. However, among this multitude and due to their similarities to humans, only a few models are commonly used in the laboratory, mainly due to regulatory and ethical constraints, the complexity of use, but also the particularly high cost they can represent. The pig (*Sus domesticus*) is notably used for the selection of probiotics, often directed against infections with *Escherichia coli* or *Clostridioides difficile*, but rarely for mechanistic purposes. The use of the dog or the monkey is quite marginal and is mainly restricted to very specific areas because their implementation requires considering considerable ethical considerations (6).

2.2.1 The mouse *Mus musculus*

The laboratory mouse *M. musculus* is a powerful model for the evaluation of host-microbiota interactions, in relation to human biology (39–41). About 99% of mouse genes are shared with humans, and the two organisms share significant similarities in the microbiome (*Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *and Actinobacteria*). Many genetic tools are available to the scientific community: many strains inbred or not, a collection of mutants and the possibility of carrying out RNA interference *in vivo*. However, experimental limitations exist. The skin, fur and oropharyngeal structures, compartmentalization of the digestive tract and behavior are different from those of humans and can have a great influence on microbial communities and therefore their impact on the host (42). A significant proportion of microorganisms from human origin are unable to colonize the murine intestine and the taxa which colonize it do not induce certain responses usually observed in the presence of the native microbiota (43,44).

This is a provisional file, not the final typeset article

2.2.2 The rat *Rattus norvegicus*

The rat is the second rodent species used in research as a model for preclinical study (45). Closer physiologically to humans, it allows to obtain experimental results that are more easily transposable to humans (46). Like for the human, the intestinal microbiota of the rat is dominated by three large phyla: *Firmicutes*, *Bacteroidetes* and *Proteobacteria* (47). The animal is used to study the impact of bacteria with probiotic potential on the intestinal level, in the case of inflammatory syndromes, in particular in connection with obesity (48–51). However, the development of the rat model has until recently been slowed down by the lack of available mutants, the first of which were only generated by genome editing tools in 2010 (52). Since then, different methods of transgenesis have been successfully applied which should accelerate the development of mutants (53).

2.2.3 The zebrafish *Danio rerio*

The zebrafish *D. rerio*, with its varied microbiota, is becoming a powerful model for studying the complexity of host-microbiota interactions. It has several characteristics that make it an attractive experimental system. The external fertilization and transparency of embryos and larvae allow the visualization of developing cells as well as the colonization of microorganisms. Its rapid development, its small size, its high degree of homology with mammals make the zebrafish a tool interesting for mechanistic studies, not only in the adaptive immune system (TLR and NOD receptors), but also in the digestive system (42). Limitations of the zebrafish model in microbiota research include differences in environmental conditions compared to humans and other model organisms (54). Although the fecal microbiota of humans and rodents can vary, it is still dominated by the phyla *Firmicutes* and *Bacteroidetes*. The zebrafish gut microbiota is dominated by *Proteobacteria* and *Fusobacteria*, with variable presence of *Firmicutes*, *Cyanobacteria* and *Actinobacteria*, and it varies considerably from one laboratory to another, notably depending on the diet (55,56).

Ethics and legislation

Researchers who need animal models are faced with ethical and legal considerations. In addition, public opinion is often not aware of the economic and societal importance of the proposed research or of the regulatory context, which also limits the unethical use of animal suffering. Researchers must also actively ensure that animal models (i) are scientifically (and statistically) validated (ii) cannot be replaced by *in vitro* alternatives and (iii) minimize animal suffering by limiting the number of animals and the duration of the experiment to what is statistically required. Research strategies and methods must be constantly challenged and objectively examined against the 3R rule established more than 50 years ago, that is, using the possibilities of replacement, reduction, and refinement (57). In addition to the proper management of pain by analgesia and anesthesia, the welfare facilities have improved considerably in accordance with the latest American and European guidelines for the accommodation of animals. Mice and rats must have sufficient space, of sufficient complexity, to express a wide range of normal behaviors and to provide enrichment opportunities to promote physical exercise, foraging, eating, manipulation and cognitive activities (6,58).

2.3 Invertebrate models

Among the invertebrate laboratory models are the fly (*Drosophila melanogaster*), the greater wax moth (*Galleria mellonella*) and the roundworm (*Caenorhabditis elegans*). These models are commonly used in the laboratory, mainly due to the facilities in terms of legislation and ethics, their easy way of use, but also their low cost. The potential probiotic capacities of new strains need the use of different and complementary approaches to be elucidated. The invertebrates represent in-between

models complementary to *in vitro* approaches and allowing the identification of scientific hypothesis justifying the use of vertebrate models.

2.3.1 The fly *Drosophila melanogaster*

D. melanogaster can allow reliable validation of probiotic effects on a living organism: high throughput screening capabilities, inexpensive and rapid reproduction, and microbiome easy to handle. In addition, many tools for studying host-microbe interaction in *D. melanogaster* are already available due to its rich history in pathogen research (59). Compared to the gastrointestinal tract of mammals, the intestine of *D. melanogaster* has several major differences, but the gastrointestinal physiology, anatomy and signaling are highly conserved (60). A wide range of strains of *D. melanogaster* available from public banks can be derived germ-free and easily maintained without requiring expensive animal facilities, equipment, and technicians (61). Compared to the human microbiota, the *D. melanogaster* microbiota has a low microbial diversity (1 to 30 species) and is generally dominated by *Lactobacillus* and *Acetobacter* (62–64). These characteristics make *D. melanogaster* an ideal high-throughput *in vivo* model for understanding host-microbiota interactions (65), in particular for screening bacteria with probiotic potential (66). However, there are weaknesses limiting the use of the fly as a model. Indeed, the infection of the animal by a microbial strain is carried out by a direct injection, which bypasses the mechanisms put in place during the first stages of an infection.

The greater wax moth *Galleria mellonella*

While it is not (yet) as genetically modifiable as *D. melanogaster* or *C. elegans*, the simplicity of handling and infection of the larvae of *G. mellonella* combined with their survival at 25 and 37 °C makes this animal a promising model (67). In research on bacterial (68,69) and fungal (70,71) pathogenesis, the larvae of *G. mellonella* have been shown to be a relevant model of infection. In their study, Vilela *et al.* used larvae as a model for pathogenic yeast infection *C. albicans* and co-infection with a beneficial strain of *Lactobacillus acidophilus* (72). Unlike *D. melanogaster* and *C. elegans*, fungal or bacterial infections and the immune defense mechanisms of the host in *G. mellonella* seem to be very close to those encountered in humans (67). Conversely, the lack of a complete genome sequence, the absence of mutant strains and the need for standardization between different sources and laboratories (67,69), are currently curbing the enthusiasm for this model.

The roundworm *C. elegans*

The strength of *C. elegans* as a model organism for microbiome research is its ability to conduct high- throughput experiments with a gnotobiotic organism and to explore the complex cause and effect relationship between presence and absence of a microbial species and a phenotype reflecting good or bad health. In fact, the microorganisms that pass through the pharynx to the intestine represent the only nutritive source for nematodes. They can thus influence the physiology of the animal through their metabolites (73). In addition, the use of nematodes for the screening of probiotics is favored by the possibility of easily monitoring anti-aging markers, as well as the storage of body fat (74,75). In addition, several genes involved in the stress response and linked to immunity are highly conserved between humans and nematodes (76).

Today, the growing interest in the effects on longevity due to probiotics has led to the need for practical *in vivo* models to understand the mechanisms of probiotic activity. In recent years, the *C. elegans* nematode has become a powerful animal model for studying host-probiotic interactions. Its advantages include ease of handling, transparency of the body, short lifespan, and the absence of ethical issues. Another important tool of *C. elegans* is the availability of transgenic animals. Many

This is a provisional file, not the final typeset article

mutants, available in libraries (CGC, https://cgc.umn.edu/), can help study the mechanism of action at the molecular level of a compound or pathways involved in the host-microorganism interaction. A collection of *E. coli* strains enabling RNAi feeding to be carried out in *C. elegans* is also available to the scientific community (*C. elegans* RNAi Collection, The Wellcome CRC Institute, University of Cambridge, UK, https://www.sourcebioscience.com/life-science-research/clones/rnai-resources/c-elegans-rnai-collection-ahringer/). For example, in an infectious context, the use of transgenic GFP nematodes makes it possible to study the response *in vivo* by fluorescence analysis (77,78). Also, several online and freely accessible tools allow any type of researcher (beginner, confirmed or expert) to access a large amount of data on the model, covering as well the fields of fundamental biology as applied (WormBase, https://wormbase.org/; WormWiring, https://www.wormwiring.org/; WormAtlas, https://www.wormatlas.org/; WormBook, http://wormbook.org/; OpenWorm, http://openworm.org/).

C. elegans model allows transcriptomic, proteomic and networks analysis, offering promising mechanistically insights opportunities (79–81). Moreover, *C. elegans* opens new perspectives in developing assays to investigate the cytotoxicity of new bioactive molecules or microbial pathogenicity and host defense mechanisms and gives new strategies to understand the mode of action (specific chemical, virulence factor). *C. elegans* allows the following of a microorganism in a whole animal with an integrated point of view, considering the gene expression using transcriptomic and proteomic approaches as well as metabolomics and physiology of the entire organism (82).

Because of its easy-to-use potential and because of the large panel of mutants (*sek-1* or *daf-16*::*gfp* mutants for example), *C. elegans* appears an efficient *in vivo* model that could be used for the screening of microorganisms collections with the aim to identify new potential probiotic strains and to investigate the molecular mechanisms involved. The potential probiotic capacities of new strains need the use of different and complementary approaches to be elucidated.

2.4 *C. elegans*: model limitations and practical interpretation pitfalls

Like all study models, the *C. elegans* nematode is not without limitations which could bias the interpretation of the results obtained (67). From a practical point of view, although the worm is rather easy to use, its total control requires a significant training. Some crucial experimental points can be quite tricky such as synchronization step or daily worms counting on solid medium spread with yeasts for example; in the absence of an automated system, its implementation is particularly time-consuming. The cell number of the worm is anyway limited (20 intestinal cells out of 959 cells for an entire worm) questioning about the relevance of the phenotypes observed and their extrapolation to humans which are composed of many different and complex tissues. In addition, the impossibility of maintaining it at 37 °C is an important limit since it can greatly affect the metabolism of the microorganisms studied. This makes it tricky extrapolating the results to humans. Moreover, the main way to provide the microorganism of interest is to feed with, which represents a risk to see them destroyed by the digestive system of the animal. Because of the worm's ability to choose its food, it is essential to ensure that the microorganism has been consumed because otherwise, the results obtained will be distorted.

In the laboratory, the nematode is conventionally propagated on axenic cultures preventing any installation of a complex microbiota within its digestive tract, which causes a drift compared to wild physiological conditions. In addition, the absence of an adaptive immune system and a variable correlation of virulence factors with mammals limit the scope and extrapolation of the experimental results.

Nevertheless, an objective critical analysis of the advantages and disadvantages of the animal still makes it possible to demonstrate that this model is suitable for carrying out preclinical tests intended for a future application in human. Indeed, the nematode represents a good intermediary between *in vitro* cell cultures and mammals. Compared to cell cultures, *C. elegans* has the obvious advantage of being an entire organism with different cell and tissue structures, which the *in vitro* approach does not or hardly allow. Because of the absence of ethical problems and of a lower cost, it allows a more precise orientation of future experiments on mammals decreasing at the same time the number of animals to use and / or sacrifice.

3 Probiotic microorganisms influence on *C. elegans* lifespan

Safety assessment is a mandatory to characterize the innocuity of any probiotic stains. In this context, one of the *in vivo* strategy to be considered is the study of the survival of the nematode (83).

3.1 Positive and negative effects of probiotics on the worm lifespan

As most living organisms, the nutrient sources used for the growth and propagation of *C. elegans* have a direct impact on its health, its defenses against pathogens and its lifespan (84).
Studies showed that the worm lifespan is increased when it is propagated on axenic cultures (85), or on agar medium with UV-killed bacteria (86,87). Moreover, *C. elegans* fed with some probiotics showed a lower bacterial load in its intestine than those fed with *E. coli* OP50, allowing an extension of the worm's lifespan (88). The behavior of *C. elegans* in contact with probiotic microorganisms, which are supposed to improve the health of the host, needed investigation.
Focusing on Lactic Acid Bacteria (LAB), some lactobacilli strains significantly increase *C. elegans* N2 (wild type) mean lifespan compared to conditions where it is fed with the standard food *E. coli* OP50. Ten lactobacilli strains (*L. fermentum, L. gasseri, L. helveticus, L. paracasei, L. plantarum,* and *L. rhamnosus*) and two bifidobacteria strains (*B. infantis*, and *B. longum*) (Figure 1A) have been shown to increase nematode survival of *C. elegans* wild-type N2 from 17% to a maximum of 46% (11,34,36,76,89–91). Other studies showed that *Lactobacillus* (*L. helveticus, L. plantarum and L. rhamnosus*) or *Bifidobacterium* (*B. infantis and B. longum*) grown under anaerobic conditions, also allowed the increase of *C. elegans* longevity with respectively 25, 22, 33, 29 and 17% of augmentation (27,84). It has been shown that the significant increase in *C. elegans* survival by *Lactobacillus gasseri* SBT2055 occurs with both live bacteria and UV-killed bacteria. This potentiation was correlated with the ratio *E. coli* OP50 / *L. gasseri* LG2055 used, *i.e.* the smaller the ratio the larger the survival rate (86). A recent study has shown an increase in longevity and an improvement in the physical functions of the host when it is fed with heat-killed probiotic strains (*L. paracasei* D3-5 and *L. plantarum* SK-9). According to the authors, these properties are associated with an anti-aging effect by maintaining high muscle mass and normal body size (91). Another study showed that a mix of *B. infantis* and *E. coli* OP50 at different proportions influenced the longevity of the worm. This information shows that it is necessary to consider the quantity of microorganisms brought to the nematode, especially the proportions in the case of a mixture, to make rigorous experiment and obtain relevant data. Also, it should be noted that the food used routinely for the maintenance of worms can have an impact on the way the worm responds to a biotic or abiotic stress. From where, there is an interest to use *E. coli* OP50, known to have little effect in *C. elegans* and should be always used as a control condition during experiment. Considering all these studies, we noticed that LAB strains exert a positive effect on the worm lifespan either alive or dead or both. Further investigations are needed to understand why this point influence the beneficial effect of a strain. It could be a strategic data to include in the process of development of new LBP. The authors agreed to suggest that the mechanism used by the bacteria to promote the longevity of the worm

This is a provisional file, not the final typeset article

involves the p38 MAPK (*i.e.* p38 Mitogen-Activated Protein Kinase) signaling pathway until the induction of the expression of *skn-1* gene and the target genes of SKN-1, encoding the antioxidant proteins (phase 2 detoxification enzymes) (86). They have also found that the cell wall (lipoteichoic acids) of Bifidobacteria plays a key role in increasing the longevity of nematodes, which is in a good correlation with other works focused on *B. longum* (92,93). Another study showed the stimulation of *C. elegans* longevity through *pmk-1* and nuclear hormone receptor (NHR), a receptor family associated with longevity in humans and animals, including *C. elegans*, even if the underlying mechanism in human remains unclear (94). Recently, the authors have shown that a mutation of the Toll-like receptor homolog TOL-1 in the nematode induced a significant increase in longevity of the host in the presence of *B. infantis*, but not in the presence of *Bacillus subtilis* nor *Clostridium butyricum*. In addition, the *tol-1* mutants exhibited reduced leaving behavior from the *B. infantis* lawn (95).

Similarly, *daf-2* (long-lived strain (96)) or *daf-16 C. elegans* (short-lived strain (97)) mutants have been shown to have an extended lifespan similar to wild-type *C. elegans* when fed with *L. gasseri* LG2055. The mechanism allowing the increased lifespan seems independent of DAF-2 or DAF-16 since their expression as well as the expression of related genes *age-1, skn-1, sek-1 and pmk-1* remained stable in these conditions. However, the phosphorylation level and consequently the cellular localization (cytoplasm or nucleus) of the transcription factor DAF-16, nor the expression of the DAF-16 regulated genes have been characterized (86).

The work of Fasseas *et al.* showed that some strains of LAB could have a negative impact on the lifespan of the worm (Figure 1B). Adult *C. elegans* N2 worms fed with live bacterial cells belonging to the species *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus reuteri* showed a significant reduction in their mean lifespan compared to those fed with *E. coli* OP50 with an average of 17, 15 and 19 days respectively. However, alive *L. salivarius* has the ability to restore a normal lifespan to short-lived *C. elegans daf-16* mutant (98) suggesting an impact of this specie to counterbalance the lack of DAF-16 function in longevity. Sugawara *et al.* showed that worms fed with killed *B. longum* in addition to *E. coli* OP50 displayed reduced worm's longevity in a *B. longum* dose-dependent manner. Moreover, aging worms fed with only killed *B. longum* displayed longer life span than those fed *E. coli* alone. This study revealed that killed *B. longum effects* in *C. elegans* were mediated by DAF-16 nuclear localization leading to the overexpression of DAF-16 target genes (99). These findings are in contradiction with previous observations with different *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains, which showed the role for SKN-1 independently of DAF-16 (99).

Although these LAB strains have a negative impact on the wild worm's lifespan, an antitumor role in *C. elegans gld-1*$^{-/-}$ mutant has been demonstrated. The lack of *gld-1*, coding for a tumor suppressor, causes the anarchic multiplication of cells, filling the body of the worm until its death. When adult *gld-1*$^{-/-}$ worms are fed with *L. salivarius* or *L. reuteri*, a significant inhibition of tumor cells growth is observed with both alive and UV-killed bacteria (98,100). Until now, the antitumor mechanism of LAB has not been elucidated even if their role in modulating the intestinal microbiota would protect against the development of colorectal cancer (101,102). These data suggest that *C. elegans* could be used as a "living laboratory" for the study of antitumor properties of LAB or other probiotics.

Although there are both probiotic species with positive effects (11,86,92) and others with negative effects (98) on *C. elegans* lifespan, there are also some that have no significant effect on the nematode lifespan. These species include, for instance, *Lactobacillus helveticus* JCM1120^{T} (86) or UV-killed *Pediococcus acidilactici* (98). Considering broader probiotic strains, Kato *et al.* showed that both living and UV-killed *C. butyricum* MIYAIRI 588 extends the lifespan of *C. elegans* through regulation of the insulin/IGF-1 signaling (IIS) pathway and the Nrf2 transcription factor. It improves resistance to several stresses in *C. elegans* such as infections with pathogenic bacteria (*S. enterica* and *S. aureus*), UV irradiation, and the metal stressor Cu^{2+} (87). Two other bacteria from human intestine and displaying probiotic capacities, *Butyrococcus pullicaecorum* and *Megasphaera elsdenii,*

extend the lifespan of *C. elegans* via the transforming growth factor-beta (TGF-β) pathway associated with anti-inflammatory processes in the innate immune system (103).

It has been demonstrated by Garsin *et al.* that the culture medium used for bacterial growth had a significant importance on the viability tests. *E. coli* cultured on brain heart infusion broth (BHI) leads a fast mortality to the nematode with a lethality time 50% (LT50) of only 6 days whereas it is not particularly pathogenic on Nematode Growth Medium (NGM). The authors also stated that two other species, *Enterococcus faecium* and *Streptococcus pyogenes*, do not show any significant worm mortality on BHI whereas this may be the case using NGM (33). Even if it is the only published work on this subject, this critical experimental point must be considered when working on the probiotic effect of microorganisms.

Although represented in an ultra-majority by lactobacilli and bifidobacteria, probiotics should not be limited to only prokaryotes. Indeed yeasts can also play this role. The recent study by Veisseire and colleagues has thus demonstrated, in *C. elegans*, the probiotic properties of the cheese yeast *Debaryomyces hansenii* Dh25 (104). The authors showed that in its presence, the nematode had a significantly increased life expectancy and was able to resist to a *S.* Typhimurium UPsm1 infection. Additional studies are nevertheless necessary to characterize the mechanisms involved. However, such studies are promising since it strengthens the antipathogenic arsenal represented by probiotics. Nowadays, although the health benefits on higher animals by probiotics are indisputable, there is no proof of an improvement of the life expectancy induced by these microorganisms except with the nematode (84). Considering that the pathways that influence aging and longevity are well conserved among eukaryotic species from yeast to mammals, including *C. elegans* (105,106), the use of this model to evaluate the potential benefits of microorganisms on human health during aging and longevity and to understand the host-microorganisms interactions is promising. The Insulin/IGF-1 signaling (IIS) pathway is in the focus of discussions concerning *C. elegans* longevity and health span. Further investigations are needed to determine if long-lived worms with reduced IIS (*daf-2* mutants) enjoy a better health related to their extended lifespan and to understand how is aging delayed in *C. elegans*. Even if the *C. elegans-E. coli* OP50 binary model does not show the same relationship than human share with its microbiota complex community, it allows the study of bacterial species for their direct or indirect role in the nematode physiology and longevity. *C. elegans* offers the possibility of carrying out screening tests on collections of microorganisms to envisage the selection of new strains with probiotic potential. These new knowledge would allow the setting up of mechanistic hypothesis for further investigating in mammalian models or on human and of new paradigms applicable to more complex organisms such as humans (107).

3.2 Mechanisms and pathways implied for worm longevity

In *C. elegans*, the regulation of life expectancy mainly involves at least three signaling pathways: DAF-2/DAF-16 (insulin-like signaling pathway), p38 MAPK and JNK pathways. In the DAF-2/DAF-16 pathway, activation of the DAF-2 transmembrane receptor induces a phosphorylation cascade via AGE-1/PI3K (phosphoinositide 3-kinase) and the Serine-Threonine kinases (PDK-1, AKT-1, AKT-2) which regulates the DAF-16/FOXO transcription factor by phosphorylating it. When DAF-16 is dephosphorylated, it is translocated into the nucleus where it activates the transcription of genes involved in lifespan control (108).

The p38 MAPK (also called PMK-1) pathway is activated through phosphorylation by upstream MAPKK (SEK-1), which is activated by MAPKKK (NSY-1). It has a role in regulating life expectancy by modulating the specific immune response of the worm and has been shown to be required in its resistance to bacterial infection (109). Under the control of PMK-1, potential antimicrobials are secreted such as C-type lectins, ShK toxins or CUB-like genes in response to *P.*

This is a provisional file, not the final typeset article

aeruginosa infection. In addition, a complete genome expression analysis suggests that the DAF-2/DAF-16 and p38 MAPK pathways are two distinct pathways since they do not positively regulate the same genes at the same time (29). Another study showed that PMK-1 contributes to the increased longevity of *daf-2* mutants and that this increased longevity was mediated by DAF-16 via the upregulation of antimicrobials (110). PMK-1 may play a similar role via distinct immune effectors to enhance lifespan suggesting that innate immunity is a key determinant of longevity. Because immunity is tightly associated with human longevity as well, further characterizing the interplay between immunity and longevity in *C. elegans* may provide us new insights into the mechanisms of human aging and age-related diseases.

The JNK (c-Jun N-terminal Kinase) pathway is activated by cytokines and in response to stresses such as UV irradiation, Reactive Oxygen Species (ROS), DNA damage, heat stress and inflammation (111,112). In *C. elegans*, this pathway evolves in parallel with the insulin signaling pathway till it converges to DAF-16 which is phosphorylated by JNK-1 (28,113) (28,113). The activation of JNK-1/DAF-16 signaling pathway leading to the overexpression of *sod-3* (superoxide dismutase) gene has been shown to be activated by *B. longum* BB68 to increase the longevity of the nematode (93).
In the case of *B. subtilis* NCIB3610, several mechanisms explaining its beneficial effects on *C. elegans* have been proposed. It has been found that one of the key conditions to promote longevity of the worm was the formation of a biofilm in the intestinal environment. The expression of *bslA* gene and the *tapA-sipW-tasA* and *epsA-G* operons, encoding essential components to the biofilm formation (Hydrophobin, TasA protein and the EPS exopolysaccharide, respectively), were identified as necessary for extending the worm's longevity (114). The second mechanism is based on the use of bacterial nitric oxide (NO) to mediate lifespan extension via the expression of a group of genes that function under the dual control of HSF-1 (an activator of heat shock proteins) and DAF-16 transcription factors (115). *C. elegans*, which is unable to synthesize NO because it lacks NO synthase, uses the one produced by the bacteria to regulate its own metabolism (114,116). NO provides better thermotolerance due to activation of HSF-1 (115). Another study focused on *Lactobacillus fermentum* MBC2 highlighted the role of fat metabolism in *C. elegans* viability, further supporting the strong correlation between reduction of fat storage and extension of lifespan in nematodes. They showed a PEPT-1-dependent pro-longevity effect, mediated by the transcriptional factor DAF-16; *pept-1* gene is one of the major regulators of fat content in *C. elegans* (76). The measure of the ratio of lipids and proteins in the worms could be informative to evaluate the potential beneficial effect of a LAB strain on its lifespan.

Recent studies suggested a key role of bacterial quorum sensing molecules in the repression of *C. elegans* infection with the pathogens *Candida albicans* or *P. aeruginosa*, showing that the nematode can detect microbial signals and develop a symbiotic interaction (117,118). The quorum-sensing pentapeptide CSF (Competence Sporulation Stimulating Factor) of *B. subtilis* has been shown to play a role in the extension of the nematode longevity (114). *B. subtilis* CSF was reported to contribute to intestinal homeostasis of the host by activating the p38 MAPK survival pathways and by inducing the synthesis of cytoprotective heat shock proteins (HSPs) (119,120). The nematode survival may be due to quorum sensing molecules such as NO and CSF and to biofilm formation (114).

All this data highlighted the idea that LAB strains can exert a beneficial effect on *C. elegans* via several specific mechanisms and pathways. *C. elegans* can be considered as a pertinent model for the screening of potential lifespan enhancing probiotics and their anti-aging compounds.

4 Protective effects of LAB against abiotic stress in *C. elegans*

4.1 Reactive oxygen species and hormesis

ROS are responsible for oxidative damage to proteins, lipids as well as to nucleic acids leading to severe mutations in DNA (121,122). A close association exists between ROS generation, ROS-related damage and aging (123). Reducing the amount of Reactive Oxygen Species (ROS) is essential to maintain a good health in most living organisms. In some model organisms such as the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the fly *D. melanogaster* or the worm *C. elegans*, low doses of ROS seem to induce promotion of health and lifespan whereas higher doses are deleterious (76,124).*D.*

This phenomenon *i.e.* the biphasic response to a potentially harmful compound, firstly described in 1943 by Southam and Ehrlich (125) under the name of hormesis, then to mithormesis (*i.e.* mitochondrial hormesis), has been discovered more recently in *C. elegans* (126). It was shown that many of the Insulin/insulin-like growth factor signaling pathway genes had a role in hormetic processes, either in response to heat stress (*e.g. daf-3* and *daf-5*), or in lifespan extension (*e.g. daf-12* and *daf-16*) or both (*daf-18)* (Figure 2). Regarding the worm, the study was focused on gene expression and thus the physiological and metabolic effects arising from thermal stress remain uncharacterized. A study showed that ROS signals are transduced mainly by the oxidative stress transcriptional factors SKN-1 (Nrf2 or NFE2L2 in mammals) and JUN-1, and partially by DAF-16. Cell biology experiments demonstrated a similarity between human DUOXs and *C. elegans* BLI-3 dual oxidases, suggesting that DUOXs are potential targets of intervention for lifespan extension. They suggest that low levels of ROS, fine-tuned by the peroxidase and dual oxidase, act as second messengers to extend lifespan by the effect of hormesis (127).

4.2 Oxidative stress

One of the indicators of the presence of a possible oxidative stress is the reduced glutathione form (GSH)/oxidized form (GSSG) ratio. Under normal physiological conditions, the reduced form predominates, in order to be subsequently oxidized by ROS if necessary (128). *L. gasseri* SBT2055 is at the origin of a 3-fold increase of the GSH/GSSG ratio compared to *E. coli* OP50 condition. Combining the increase in SOD activity and a greater amount of reduced glutathione, *L. gasseri* SBT2055 has been shown to play an important role in reducing ROS and damage related to oxidative phenomena (86).
L. gasseri SBT2055, a lactic acid bacterium previously mentioned for its ability to increase the lifespan of the nematode, also allows the host organism to fight effectively against oxidative stress. Analyses of 10-day-old adult worms fed with *L. gasseri* SBT2055 showed a significant overexpression of *sod*-1 gene and an 80% increase in superoxide dismutase activity compared to worms fed with *E. coli* OP50 as well as an enhanced activity of the Nrf-2 ortholog SKN-1. The same molecular anti-oxidative mechanism has been identified in mammalian cells, protecting cells against oxidative stress (129). Many other genes have been reported to have significant over-expressions such as *trx-1*, *clk-1*, *hsp16.2* or *gcs-1* respectively encoding a thioredoxin, a mitochondrial polypeptide, a heat-shock protein and an ortholog of the γ-glutamyl-cysteine synthetase (86).
L. rhamnosus CNCM I-3690, in addition to its beneficial effects of the worm's lifespan, gives *C. elegans* a protection against oxidative stress. This strain causes activation of DAF-16 transcription factor, which subsequently induces an increased longevity, a decrease in the amount of lipid inclusions and an increased resistance to hydrogen peroxide. These three effects are the result of the reduction of the inflammatory process. In addition, similar results were observed *in vitro* using dendritic cells culture where *L. rhamnosus* was actively involved in reducing pro-inflammatory cytokine ratios such as IL12/IL10, IL6/IL10, IL8/IL10 and TNFα/IL10 (11). Another study showed that worms fed with killed *B. longum* in addition to *E. coli* OP50 had a higher survival rate, compared with worms fed *E. coli* alone, following hydrogen peroxide-induced oxidative stress and heat stress at 35 °C (99).

This is a provisional file, not the final typeset article

4.3 Heat stress

C. elegans, like most living species, is sensitive to temperature and can set up various defense strategies. A whole range of highly conserved genes, under the control of the two thermosensory neurons (AFDs), are activated (130) to restore cellular homeostasis when the organism detects a rapid rise in temperature (131). The lactic acid bacteria *L. gasseri* SBT2055 allows significant resistance of *C. elegans* to heat stress, without the underlying mechanism being evoked (86).
B. subtilis, although not part of the lactic acid bacteria group, possesses interesting probiotic capabilities. A recent study concerning *C. elegans* resistance against heat stress showed that the strain *B. subtilis* NCIB3610 induced a lifespan 132% higher on average compared to worms that were fed with standard *E. coli* OP50 strain. Similar results have also been observed in the case of osmotic and heavy metal stresses (114).
Concerning these abiotic stresses, some authors hypothesized that the probiotic may have a similar effect in mammals but, even if signaling pathways are well conserved, the possibility to extrapolate this data from nematodes to mammals has to be investigated (11,129,132).

5 Influence of LAB on *C. elegans* immunity

The protection of an organism against a pathogen, whether it be a mammal, a bird or a nematode, involves highly conserved signaling pathways (110). In *C. elegans*, two major signaling pathways (Figure 3) are involved in the innate immune response: the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways and the Insulin / IGF1 Signaling (ILS) pathway or DAF-2/ Insulin-like Receptor (DIR) (133).
MAPK pathways, considered to be the oldest transduction pathways of immunity (134), combine several types of cascades in *C. elegans*. The main, p38 MAPK, originally described for its action against Gram-negative bacteria, is also described for Gram-positive and fungi (133,135). Two genes, essential for resistance to pathogens, have been identified namely *sek-1* and *nys-1*, respectively coding for a MAP kinase kinase (MAPKK) and a MAP kinase kinase kinase (MAPKKK) (134). The probiotic *L. fermentum* JDFM216 is able to induce the over-expression of genes from C-lectin family, including *clec-60* and *clec-78*, as well as F-box protein and NHR related genes, as a consequence of PMK-1 signaling activation (34). Therefore, it seems that this bacterium can induce an immune response in the nematode during a possible infection. It has been shown that p38 MAPK is involved against cytolytic pore-forming toxins such as *Bacillus thuringiensis* Cry5B toxin (136).
The second main pathway, the DAF-2/Insulin-like receptor (DIR) pathway involving the transcription factor DAF-16, also plays a major role in the immune response although this is not fully understood (133). Transcriptomic analysis revealed DAF-16 promoted the expression of genes linked mainly to longevity and to defense against pathogens (137,138).
Parallel to the DAF-2/DAF-16 pathway, the c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway is activated by environmental stresses and inflammatory cytokines and acts as a molecular sensor for the pathway DAF-2/DAF-16 (139). Some constituents of the cell wall of lactic acid bacteria, such as muramyl dipeptide (molecule on the basis of the parietal peptidoglycan), are involved in the activation of the immune response and in particular the synthesis of cytokines (TNFα and IL-1 in mammals) by immunocytes (84). These cytokines are activators of c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway, which is a DAF-16 positive regulator (113).
C. elegans presents different transcriptional responses depending on the fungal or bacterial infection origin (116,140). The genes *fil-1* and *clec-71*, respectively encoding for a lipase and a C-type lectin are upregulated by both *P. aeruginosa* and *S. aureus* but not by *C. albicans*. Gram-positive and Gram-negative bacteria also induce a separate response *i.e.* in the presence of *P. aeruginosa*, there will be an overexpression of *crp-3* (peptidase), *cyp-35A2* and *cyp-35C1* (cytochrome P450) genes

while in the presence of *S. aureus*, *pmp-1* (ABC transport), *gst-28* (glutathione S-transferase) and *lys-5* (lysozyme) genes are overexpressed. There is a common immune response to all three genera *Candida*, *Staphylococcus* and *Pseudomonas* including the induction of the *far-7* (nematode fatty acid retinoid binding) and *cyp-37B1* (cytochrome P450) genes whereas *sams-1* (S-adenosylmethionine synthetase), *acdh-1* (acyl-CoA dehydrogenase) and *nhr-114* (ligand binding domain of nuclear hormone receptor) genes are repressed (116,140). Another study showed that *nhr-86* induces innate immune defense independent of the p38 MAPK *pmk-1* in response to *P. aeruginosa* (141). Finally, a study demonstrated that *C. elegans* response to infection by *B. thuringiensis* showed significant profile changes at the level of proteome, such effect being under the influence of AMP-activated protein kinases (AMPKs) which were supposed to be regulators of the worm immune response (82).
C. elegans has neither phagocytic cells nor an adaptive immunity. Comparing to human, the single toll-like receptor does not seem to play a role in the immune response and the nematode has no NF-κB-like factor (34,142). Anyway, because of the great conservation of the signaling pathways involved in innate immunity across species, *C. elegans* could be a tool of interest for the molecular characterization of immune pathways. Complementary approaches such as the use of *C. elegans* mutants and transcriptomic will allow the analysis of the immune pathways that are modulated by LAB.

6 LAB anti-pathogen effects

In nature, *C. elegans* is found in numerous ecological niches and is likely to be host to yeasts like *Candida* or to bacteria such as *Pseudomonas*, *Enterococcus* (116)(116), *Micrococcus luteus*, *Bacillus megaterium* (143) or *Comamonas aquatica* (144). The greater majority of worms have their intestine colonized by bacteria, especially those fed *in vitro* with *E. coli* OP50, as early as 2 days of adulthood (145).

S. enterica serovar Enteritidis, a pathogenic enterobacterium for humans, is capable of inducing mortality in *C. elegans* in just a few days (40% in 5 days) after invading its intestine. However, the young adults (3 days) are resistant both to the colonization of their intestine by *Salmonella* and to its pathogenicity compared to the 5-day-old worms. A resistance to infection was highlighted in elderly adults (7 days) fed with probiotic bacteria (*L. helveticus, L. plantarum, L. rhamnosus, B. infantis* and *B. longum*) before infection by the pathogen. It is interesting to note that the pathogenicity of *S.* Enteritidis in the nematode requires alive bacteria; otherwise, *C. elegans* has a lifespan quite like that encountered with *E. coli* OP50. *L. rhamnosus*, *plantarum* and *helveticus* have been reported providing a much better resistance to *S.* Enteritidis infection in the worm without limiting its presence in the intestine. Consequently, the mechanism of inhibition of the virulence of *S.* Enteritidis would not be due to the synthesis of antimicrobial compounds but rather to a certain immunotolerance (84). Rangan *et al.* showed that the antigen A SagA secreted from *E. faecium* is sufficient to promote pathogen tolerance in a *tol-1* dependent manner, protecting *C. elegans* against *Salmonella* pathogenesis (132). This protective activity has been observed in mice as well. In worms fed *E. faecium* L11, the increased expression of genes related to the MAPK pathway (*pmk-1* and *sek-1*) and to the TGF-β pathway (*dbl-1* and *sma-3)* was shown to contribute to the resistance against *Salmonella* infection (35). Lysozymes, such as LYS-8 which is under the control of *dbl-1* and *sma-3,* and lectins were identified as antimicrobial peptides that help to nematode defense against infection (146). Recently, a study has focused on the antimicrobial properties of the probiotic strain *E. coli* Nissle 1917 (EcN) against infection by enteropathogenic *E. coli* (EPEC). The authors showed that EcN inhibited the pathogenicity of EPEC by competitive colonization of *C. elegans* intestine. In addition, they also demonstrated that EcN enhances the integrity of the intestinal barrier via the induction of Zonula occludens ortholog (Zoo-1), a tight junction protein (147). A transcriptomic

This is a provisional file, not the final typeset article

study showed that *Pediococcus acidilactici* P25 affects the expression of genes relative to innate immune response, peroxisome, longevity, and MAPK pathways and reduced the gut colonization of the worm and the expression of enterotoxin genes by *E. coli* ETEC K88 (148). In addition, the work of Chelliah and colleagues has shown the benefit of using antimicrobial peptides isolated from the cell-free supernatant of *Pediococcus* to treat bacterial infections. Indeed, after preincubation with a molecule produced by *P. acidilactici* and molecular weight lower than 3 kDa (pediocin), nematodes showed increased survivals facing *E. coli* O157 and *Helicobacter pylori* infections. This increased survival was also associated with a significant decrease in the bacterial load in the gut of the worms (149).

The pathogen *C. albicans* ATCC® 10231™ can induce a 100% mortality in *C. elegans* in 3 days. *L. rhamnosus* Lcr35®, in addition to having a pro-longevity activity, protects the worm from a *C. albicans* infection (+267% of survival) even if the yeast is still detectable in its intestine. At the mechanistic level and during a preventive treatment, genes of the p38 MAPK signaling pathway are repressed and genes involved in the antifungal response are induced by Lcr35®, suggesting that the pathogen appears not to be detected by the worm immune system. However, the DAF-16/FOXO transcription factor, implicated in the longevity and antipathogenic response of *C. elegans*, is activated by Lcr35®, suggesting that the probiotic strain acts by stimulating its host *via* DAF-16 but also by suppressing the virulence of the pathogen (90). However, in a second study, the authors showed for the first time the effectiveness of a Live Biotherapeutic Microorganism (i.e. *L. rhamnosus* Lcr35®) in a curative context against candidiasis and a different mechanism of actions with, the activation of the p38 MAPK pathway in the nematode (150). It has been also demonstrated that molecules involved in bacterial quorum-sensing such as indole and its derivative, indole-3-acetonitrile (IAN) were able to significantly alleviate the virulence of *C. albicans* in *C. elegans* reducing the fungal burden in the intestine (118). In another study, a clinical isolate of *L. paracasei* increased the survival of *C. elegans* infected with *C. albicans* by 29%. This prolonged longevity was accompanied by the inhibition of filamentation of *C. albicans* ATCC® 18804™, preventing the cuticle rupture of the worms of 27%. A negative regulation of the *tec1* and *ume6* genes that are essential for the production of hyphae was suggested to explain the reduced filamentation of *C. albicans* (151). However, the authors have not demonstrated the effect of *L. paracasei* on the immune response of the nematode.

With regard to colonization of the intestine, the prerequisite that one condition for a microbial strain to be recognized as probiotic is its ability to colonize the gut (if used orally) is controversial (152,153). In spite of the fact that *L. gasseri* SBT2055 had undeniable positive effects on the worm and that its presence in its intestine had been confirmed, it is unable to colonize it (86). It would be of interest to follow *L. gasseri* STB2055 population to specify whether it constitutes a transient microbiota or if it is destroyed in the digestive tract. It has also been shown that *L. plantarum,* as well as *L. zeae* LB1 and *L. casei* CL11, was able to colonize the *C. elegans* intestine and to remain on it over 4.3 CFU/mL per worm (this is higher than 3.2 CFU/mL per worm obtained with *L. rhamnosus* GG), thereby contributing to the inhibition of *S. aureus* by stimulating the innate immune system but the underlying mechanisms are not clearly defined (74)(74). Another study evaluating 15 probiotic strains including *L. plantarum* K90 and *L. paracasei* CD4 that exhibited increased nematode lifespan showed that gut colonization ability differs among the strains tested (154). The last study of Sharma suggests that the adhered probiotic strains inhibit the attachment of *E. coli* pathogenic strains on the intestinal layer of *C. elegans*, blocking receptors sites and reducing pathogen colonization (89). A study on 35 strains of LAB showed the ability of three strains, *L. brevis, P. acidilatici* and *P. pentosaceus,* to increase the lifespan of *C. elegans* infected with *P. aeruginosa* PA14 and to colonize the *C. elegans* gut (32). In the Ikeda *et al.* study, lactic acid bacteria have not been able to reduce the colonization of the intestine by the pathogen which may be the sign of the absence of synthesis of antimicrobial compounds (84). This lack of inhibition of colonization of the gut by a pathogen has

also been demonstrated with enterotoxinogenic *E. coli* (ETEC), a deadly strain for *C. elegans,* in the presence of *L. zeae* LB1 and *L. casei* CL11. In the present case, the protection of the worm by the probiotics is due to the inhibition of the enterotoxins synthesis whose mechanism is not yet understood (155). Both lactobacilli, as well as the *L. plantarum* JDFM LP11 and the *L. rhamnosus* GG (36) are able to colonize the intestine of the worm and are found at the rate of 10^4 à 10^5 CFU/worm, as much as for ETEC. The relevance of intestinal colonization for a probiotic strain to exert its optimal effect must be further characterized in the worm before to be studied in mammals and extrapolated to human.

The enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) O157:H7 strain also exhibits significant pathogenicity to *C. elegans*, thereby reducing its lifespan compared to an avirulent bacterium. A study using the probiotic *E. faecalis* (marketed under the name Symbioflor® (Symbiopharm, Herborn, Germany)) showed that *E. faecalis* exerted a protective effect, significantly reducing the mortality of *C. elegans* due to EHEC. A mix *E. faecalis—E. coli* O157:H7 restored partly a lifespan but not as that observed with *E. coli* OP50 or Symbioflor® alone. It is of interest to note here the potentialization of the *E. faecalis* strain anti-EHEC effect by the galenic Symbioflor®. This beneficial effect of *E. faecalis* was explained by the fact that the probiotic negatively regulates a large number of genes associated with the virulence of *E. coli* O157: H7 like *espA*, *espB*, *espD* (encoding for LEE structural element) or *sepQ* (pore forming protein) (156). However, the *stx1B* and *stx2B* genes both encoding for Shiga-like toxin subunits are not repressed in the presence of the probiotic (156), as was the case with *L acidophilus* (157)—(157). The authors made the hypothesis that the inactivation of the toxin can be explained by the fact that both *E. coli* and *E. faecalis* are lysed by the grinder of the worm and that the fragments of *E. faecalis* inhibit the fixation of toxins on cellular receptors (156). At the early infection by enterohaemorrhagic *E. coli,* the p38 MAPK pathway, involved in the innate immune response is induced by Stx-1 toxin (158). In the case of *L. pneumophila*, it appears that when adult *C. elegans* is fed with *B. infantis* and then exposed to *L. pneumophila*, a significantly increased resistance to the pathogen was observed although *B. infantis* did not reduce the amount of the pathogen in the gut. This strengthening of the immune system would imply, as for longevity, the PMK-1/p38 MAPK signaling system (159).

In addition, opposite bacterial responses were highlighted. Feeding *C. elegans* with *L. acidophilus* will result in protecting the worm against infections of pathogenic Gram-positive *E. faecalis* and *S. aureus* but not against *P. aeruginosa* (160) which is a Gram-negative bacterium. Moreover, exposing *C. elegans* with a non-pathogenic Gram-negative bacterium, *P. mendocina*, will have a positive action against infections of the pathogen *P. aeruginosa* PA14 (116). All these data show that the beneficial or deleterious effect of a bacteria on *C. elegans* remained strain dependent leading to suggest that a characterization of the interaction mechanisms are needed. A question is then arising concerning these contradictory effects of the same strain for future applications on human health.

In conclusion concerning the anti-pathogen effects of probiotics observed in *C. elegans*, it looks like only part of the signaling pathways are characterized. The molecular mechanisms underlying the interactions between probiotics, pathogens and hosts have yet to be explored. Moreover, the role of probiotics gut colonization in the resistance to pathogens is not clearly evaluated and would be strain dependent. A strain-by-strain molecular study using complementary approaches on *C. elegans* appeared to be necessary to highlight the probiotic potential of a microorganism. Another application using the worm would be to test the anti-pathogen potential of microbial consortia (bacteria and fungi) rather than single microorganism. The data obtained would help us to understand the link between microbiota and health *i.e.* anti-pathogen effect, aging, immunity and to design strategies to fight against a large panel of pathogens. Moreover, *C. elegans* seems to be less susceptible than mammalian cells to antibiotic drugs targeting the lipid-bilayer membrane of the pathogenic microorganism *S. aureus* (34,142).This point concerning the host cell physiology has to be considered when evaluating the anti-pathogen potential of a new probiotic strain dedicated to human

This is a provisional file, not the final typeset article

health. It also seems important to be interested in the impact of probiotics on the physiology (general morphology, structural integrity) of the nematode after the ingestion of these microorganisms, in a qualitative (microscopy) and quantitative way by methods of transcriptomics or proteomics (i.e. expression and translation of cuticle proteins). Finally, it is necessary, through mechanistic studies, to precisely establish the link between the immune response, the effective defense against a pathogen and other fundamental biological functions such as longevity.

7 Translational research and prospects

7.1 The roundworm as a model system to study human diseases

Molecular decoding of host-microorganisms interactions mechanisms requires the implementation of *in vitro* and *in vivo* approaches to investigate their biochemical, genetic, and phenotypic components. A better understanding of genes and their interacting partners forms the foundation for translational research leading to mechanism-based therapeutic strategies (161). In absolute terms, studying humans to understand the molecular mechanisms of human disease could be considered as the ideal solution. However, Humans are poor subjects for these studies because of heterogeneous genetic backgrounds, low reproductive rate, generation times far too important for experimental studies, wide variations in gene expression, subject to strong environmental variations and experimentations on humans are unethical. To circumvent these issues, *C. elegans* is being exploited to decipher human biology thanks to its properties such as the availability of molecular tools and genome sequenced and annotated, the availability of a bank of mutants, crossbreeding facilities to study genetic, high reproducibility rate and homologies with humans (161).

The number of human disease-related genes that share homology with *C. elegans* genes ranges from 40–75% (162). Even in the absence of an orthologous gene, it is likely that there are protein domains or parts of biochemical pathways in *C. elegans* that are sufficiently conserved to allow the extrapolation of the mechanisms from the nematode to a model of human pathobiology (164).

Although *C. elegans* is a bacterivorous organism, these animals are killed by a variety of human pathogens including Gram-negative (*P. aeruginosa*, *S. enterica*, *Serratia marcescens*, *Burkholderia cepacia*) and Gram-positive organisms (*S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *E. faecalis*) as well as fungi (*Candida* species) (33,84,140,150,160). Several studies show that many of the host resistance (e.g., antimicrobial peptides (AMPs), MAPK signaling cascades) and bacterial (and fungal) virulence factors (e.g., *Pseudomonas* exotoxin A, *Staphylococcus* V8 protease) that operate in *C. elegans* infection models are the same in plants, arthropods and mammals. Thus, *C. elegans* infection models can serve as a useful system for dissecting apart the molecular components of host-pathogen interactions. Although evolutionarily distant from humans, *C. elegans* and humans share many conserved cellular pathways. Using a forward genetics screen for genes that enhanced susceptibility to pathogens, *C. elegans* was shown to possess several well-defined MAPK signaling cassettes (including those associated with PMK-1 (p38), KGB-1 (JNK) and MPK-1 (ERK)) that are crucial for the innate immune defense (165) and are found in arthropods and mammals. Taken together, genetic mutant analysis, transcriptional profiling and biochemical studies in *C. elegans* show that MAPK signaling is one of the primordial, yet still essential, stress response pathways in eukaryotes (166). Notably, insulin and TOR pathways function in *C. elegans*, as in other organisms, to coordinate nutrient and metabolic state with cellular processes (167). A better delineation of these signaling pathways should enhance our understanding of innate host resistance to a range of human pathogens. Nutrition is paramount in shaping all aspects of animal biology. In addition, the influence of the intestinal microbiota on physiology is now widely recognized. Given that diet also shapes the

intestinal microbiota, this raises the question of how the nutritional environment and microbial assemblages together influence animal physiology. Leulier *et al.* proposed an integrative framework within which to define the study of the diet-physiology-microbiota systems and ultimately link it to human health (168). *C. elegans* are bacterivorous that can survive on a variety of bacterial species. For *C. elegans*, bacteria are both diet and microbiota. These bacteria influence metabolism, life history traits and gene expression (143,144).

Taken together, these studies confirmed that live whole animal screens using *C. elegans* could be used as a biologic platform for potential probiotic strain discovery and characterization.

7.2 Challenges and opportunities

Most studies using *C. elegans* as an *in vivo* model concern the anti-pathogenic effect of bacterial strains that could be used to fight against human pathogens but the major challenge is now to go further insight the mechanisms involved in the antimicrobial capacities of beneficial microorganisms. These studies have been facilitated by the discoveries of natural microbes that infect *C. elegans*, including bacteria, fungi, and viruses. Many of these microbes share a common site of infection, the *C. elegans* intestine that is the way of exposure of many pathogens as in higher eukaryotes. *C. elegans* possesses many of the characteristics of an efficient model for the characterization of a probiotic strain and to define host-microbes and microbes-microbes interactions. It is a powerful and easy-to-use model already used to evaluate the impact of microorganisms on *C. elegans* longevity, immunity and to study their anti-pathogen effect. It offers the opportunities to investigate link between innate immunity and aging as well as between intestinal microbiota and aging. Moreover, the *C. elegans* model can be used to evaluate the safety of microorganisms, evaluating its lifespan (169). The challenge to validate *C. elegans* as a relevant model to study strains safety is to evaluate how can be made the parallel with humans (170). *C. elegans* offers good opportunities to make this link because of its strong similarity between worm and human intestinal cells in terms of physiology and functionalities. This model can be used to study a large panel of pathogenic and probiotic microorganisms with the aim to further investigate human disease mechanisms. Moreover, novel approaches are needed to develop microbial cocktails targeted to restore dysbiotic states in microbiota-associated human diseases (171). In the coming years, it could be added in screening platforms for the development of new LBPs according to a strategic workflow (Figure 4a). A collection of microorganisms of interest must be tested by conventional *in vitro* methods to select strains that meet the eligibility criteria defined in the literature. These candidates are then characterized using *C. elegans* and preclinical models. The final necessary step before an application in human health remains the clinical trials. Future *C. elegans* research objectives are to characterize the mode of action of probiotic strains to better understand their effects on humans and to develop even better live biotherapeutic products to treat a larger panel of human dysbiosis-related affections. Even though this nematode has become one of the most intensively studied models in biological research, a full analysis of its biology would warrant further integration of this information into the research approaches (172). In addition to the strain-specific approaches, we must also take into consideration the industrial process for a large-scale production of a probiotic strain. A native probiotic strain may present different or potentiated properties depending on the culture conditions, the drying process and the galenic (153,156,173,174). *C. elegans* could be a strategic model to test the secondary effects of new drugs (impact on its lifespan) or new formulations.

Studies using *C. elegans* as an *in vivo* model with the aim to characterize probiotic potential of bacterial strains are largely focused on lactic acid bacteria. Some other kinds of microorganisms such as anaerobic bacteria and fungi could be of interest as probiotics and their characteristics could be

This is a provisional file, not the final typeset article

evaluated using *C. elegans*. Few studies have been published concerning these kinds of microorganisms (*Aeromonas, Vibrio cholera, Mycobacterium avium*). Because no published data exist concerning the physicochemical environment in *C. elegans* intestine (pH, oxygen level), the feasibility of anaerobic bacteria studies on *C. elegans* must be investigated.

A collection of human pathogens has been studied using *C. elegans* model (Table 2). Future opportunities could be to enlarge the panel of pathogens studied. The study of Hwang *et al.* (175) demonstrated that *C. elegans* is an effective model to examine and compare the pathogenicity and virulence variation of STEC strains (24 strains tested) to that of *E. coli* OP50 strain. White and Herman (80) demonstrated the merit of a *C. elegans* approach in the identification of novel genes that are involved in combating the emerging nosocomial bacterial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia* infection. The work of Wan *et al.* (176) provides new insights into the pathogenesis of *B. thuringiensis*, and highlights the importance of breaking down host epithelial junctions for a successful infection. A similar mechanism could be used by other pathogen-host interactions since epithelial junctions are conserved structures from insects to mammals. Efforts have to be made to further elucidate the evolutionary conserved mechanisms of bacterial and fungal pathogenesis as well as of host-microbes interactions. A lethal impact of microbiota of inflamed colon from inflammatory bowel disease (IBD) patient's toxicity in *C. elegans* compared with microbiota from the non-inflamed site of the colon was reported. Moreover, in these conditions, the co-exposure of human pathogen *Giardia duodenalis* increased lethal toxicity (177). Another study showed that co-infection of *C. elegans* with two human pathogens such as *C. albicans* and *E. faecalis*, had less severe toxic impact than either pathogen alone. The authors hypothesized that this observed effect was due to inhibition of *C. albicans* induced hyphal morphogenesis by *E. faecalis* derived antifungal compounds (178). This worm model offers the opportunity to explore potential trans-kingdom interactions, to define the function of the commensal microbiota and the host-microbiota-pathogens interactions. The next challenge is to use *C. elegans* to study multi-infections to define the relationships and the influences of microbes on each other. In the coming years, this *in vivo* model could be widely used to better characterize microorganisms using omics approaches associated with automation. Although being one of the most common procedures required during *C. elegans* research, counting nematode numbers is a time-consuming and fastidious process, and prone to errors. A new estimation procedure needs to be developed to make faster and reliable data collection from a worm population. A technical progress through automation would allow to enlarge applications to the screening of large microorganisms collections (179,180). Microfluidic represents new perspectives to manipulate *C. elegans* in a high-throughput fashion to perform automated studies using high-resolution imaging methods (181). There is an urgent need for the discovery of effective new antimicrobial agents to combat the rise of bacterial drug resistance. High-throughput screening (HTS) in whole-animal infection models could represent a powerful tool for identifying compounds that show antibacterial activity and low host toxicity (182–184). Research works are focused on LAB and their anti-pathogen activities, their capacities to extend lifespan of *C. elegans* and to manage with oxidative stress and inflammation, but some domain of research in relation with human health and nutrition have not been exploited yet.

According to its natural complex living environment, it is likely that the wild *C. elegans* intestine is colonized with many different microorganisms. With the aim to be ever closer to the human intestine, one of the future challenges will be to deal with a diversified worm fed, to manage colonization of *C. elegans* intestine with a consortium of strains (185). It would be of interest to enlarge the panel of experiments with *C. elegans*, feeding it with a complex microbiota (intestinal, vaginal, buccal, etc.) or with fermented food (raw milk cheese) to evaluate the impact of these microorganisms mixes on its lifespan, to observe the transit of the microorganisms through the intestine and then their potential

to colonize it. The feasibility of using this model to generate human-like microbiota in the worm intestine has never been reported but represents a scientific challenge for large scales studies focusing on host-microbiota or host-holobiont.

8 Conclusion

The literature mainly highlights the probiotic impact of LAB strains exerting highly beneficial effects on *C. elegans* whether it be on biotic and abiotic stresses or on immunity. The fact that the worm presents genetic, functional, and physiological similarities with humans represents a plus value to *in vitro* cell-culture strategies to investigate molecular probiotic mechanisms. The *C. elegans* model provides a large range of opportunities to explore trans-kingdom interactions and to solve questioning about the molecular aspect of these interactions. It represents a pertinent, easy-to-handle, cheap and rapid tool for the screening of microorganisms' collections looking for specific probiotic characters. *C. elegans* should emerge as one of the most powerful, bioethical, and pertinent go-between model host between *in vitro* and mammalian models.

9 Conflict of Interest

Adrien Nivoliez had an institutional affiliation with the company which manufactures Lcr35 products.

Author Adrien Nivoliez was employed by the company biose® Industrie. The remaining 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.

10 Author Contributions

C.P., C.C. and S.B.: writing-original draft; A.N. and S.B.: supervision.

11 Funding

This work was supported by the European funds FEDER and the Auvergne-Rhône-Alpes Region in the form of grants to C.P. as well as biose® as part of the doctoral thesis of C.P. The funder biose® provided support in the form of salaries for A.N.

12 Acknowledgments

Cyril Poupet PhD thesis was supported by the European funds FEDER, Auvergne-Rhône-Alpes Region and biose®.

13 References

1. FAO, WHO. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. *Food Nutr Pap* (2001) doi:10.1201/9781420009613.ch16

2. Olle B. Medicines from microbiota. *Nat Biotechnol* (2013) **31**:309–315. doi:10.1038/nbt.2548

3. Desreumaux P, Pavan S, Mercenier A. Probiotiques, prébiotiques et symbiotiques. *La Lett l'hépato-gastroentérologue* (2000) **III**:335–337. Available at: http://www.edimark.fr/Front/frontpost/getfiles/5196.pdf [Accessed January 8, 2017]

This is a provisional file, not the final typeset article

4. Plaza-Diaz J, Ruiz-Ojeda FJ, Gil-Campos M, Gil A. Mechanisms of Action of Probiotics. in *Advances in Nutrition*, S49–S66. doi:10.1093/advances/nmy063

5. Shokryazdan P, Jahromi MF, Liang JB, Ramasamy K, Sieo CC, Ho YW. Effects of a *Lactobacillus salivarius* mixture on performance, intestinal health and serum lipids of broiler chickens. *PLoS One* (2017) **12**:1–20. doi:10.1371/journal.pone.0176065

6. Papadimitriou K, Zoumpopoulou G, Foligné B, Alexandraki V, Kazou M, Pot B, Tsakalidou E. Discovering probiotic microorganisms: *In vitro*, *in vivo*, genetic and omics approaches. *Front Microbiol* (2015) **6**:1–28. doi:10.3389/fmicb.2015.00058

7. Douglas AE. Which experimental systems should we use for human microbiome science? *PLOS Biol* (2018) **16**:e2005245. doi:10.1371/journal.pbio.2005245

8. Zannad F, Pletan Y. Difficultes a La Realisation Des Essais Cliniques En France. (2000)

9. Lacroix C, de Wouters T, Chassard C. Integrated multi-scale strategies to investigate nutritional compounds and their effect on the gut microbiota. *Curr Opin Biotechnol* (2015) **32**:149–155. doi:10.1016/j.copbio.2014.12.009

10. Richmond J. Refinement, reduction, and replacement of animal use for regulatory testing: future improvements and implementation within the regulatory framework. *ILAR J* (2002) **43 Suppl**:S63–S68. doi:10.1093/ilar.43.Suppl_1.S63

11. Grompone G, Martorell P, Llopis S, González N, Genovés S, Mulet AP, Fernández-Calero T, Tiscornia I, Bollati-Fogolín M, Chambaud I, et al. Anti-Inflammatory *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-3690 Strain Protects against Oxidative Stress and Increases Lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* (2012) **7**: doi:10.1371/journal.pone.0052493

12. Gammon DB. *Caenorhabditis elegans* as an Emerging Model for Virus-Host Interactions. *J Virol* (2017) **91**:e00509-17. doi:10.1128/JVI.00509-17

13. Issi L, Rioux M, Rao R. The Nematode *Caenorhabditis Elegans* - A Versatile *In Vivo* Model to Study Host-microbe Interactions. *J Vis Exp* (2017) doi:10.3791/56487

14. Kumar A, Baruah A, Tomioka M, Iino Y, Kalita MC, Khan M. *Caenorhabditis elegans*: a model to understand host–microbe interactions. *Cell Mol Life Sci* (2019) doi:10.1007/s00018-019-03319-7

15. Riddle DL, Blumenthal T, Meyer BJ, Priess JR. "Section II Origins of the Model," in *C. elegans II.* (New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), 1948–1950. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20127/ [Accessed February 9, 2017]

16. Brenner S. The genetics of behaviour. *Br Med Bull* (1973) **29**:269–271. doi:https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a071019

17. Brenner S. *The nematode Caenorhabditis elegans*. Cold Sprin. , ed. W. Wood Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988).

18. Ewbank JJ. Tackling both sides of the host – pathogen equation with *Caenorhabditis elegans*. *Microbes Infect* (2002) **4**:247–256.

19. Dong X, Liu OW, Howell AS, Shen K. An extracellular adhesion molecule complex patterns dendritic branching and morphogenesis. *Cell* (2013) **155**:296–307. doi:10.1016/j.cell.2013.08.059

20. Couillault C, Kurz CL. Du nématode *Caenorhabditis elegans* et de son utilisation en laboratoire. *Stal* (2010) **36**:59–74.

21. McGhee J. The *C. elegans* intestine. *WormBook* (2007)1–36. doi:10.1895/wormbook.1.133.1

22. Balla KM, Troemel ER. *Caenorhabditis elegans* as a model for intracellular pathogen infection. *Cell Microbiol* (2013) **15**:1313–1322. doi:10.1111/cmi.12152

23. The C. elegans Sequencing Consortium. Genome Sequence of the Nematode *C. elegans*: A Platform for Investigating Biology. *Science (80-)* (1998) **282**:2012–2018. doi:10.1126/science.282.5396.2012

24. Lai CH, Chou CY, Ch'ang LY, Liu CS, Lin W. Identification of novel human genes evolutionarily conserved in *Caenorhabditis elegans* by comparative proteomics. *Genome Res* (2000) **10**:703–13. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10810093 [Accessed September 10, 2018]

25. Wormbase. daf-2 (gene). (2011) Available at: http://www.wormbase.org/species/c_elegans/gene/WBGene00000898#0-9g-3 [Accessed February 15, 2017]

26. Wormbase. daf-16 (gene). (2015) Available at: http://www.wormbase.org/species/c_elegans/gene/WBGene00000912#0e-9g-3 [Accessed February 15, 2017]

27. Sun L, Zhi L, Shakoor S, Liao K, Wang D. microRNAs involved in the control of innate immunity in *Candida* infected *Caenorhabditis elegans*. *Sci Rep* (2016) **6**:36036. doi:10.1038/srep36036

28. Marudhupandiyan S, Balamurugan K. Intrinsic JNK-MAPK pathway involvement requires *daf-16*-mediated immune response during *Shigella flexneri* infection in *C. elegans*. *Immunol Res* (2017) **65**:609–621. doi:10.1007/s12026-016-8879-6

29. Zhou M, Liu X, Yu H, Yin X, Nie S-P, Xie M-Y, Chen W, Gong J. Cell Signaling of *Caenorhabditis elegans* in Response to Enterotoxigenic *Escherichia coli* Infection and *Lactobacillus zeae* Protection. *Front Immunol* (2018) **9**:1745. doi:10.3389/fimmu.2018.01745

30. Tan MW, Rahme LG, Sternberg JA, Tompkins RG, Ausubel FM. *Pseudomonas aeruginosa* killing of *Caenorhabditis elegans* used to identify *P. aeruginosa* virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1999) **96**:2408–13. doi:10.1073/pnas.96.5.2408

31. Tan MW, Mahajan-Miklos S, Ausubel FM. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa* used to model mammalian bacterial pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1999) **96**:715–20. doi:10.1073/pnas.96.2.715

This is a provisional file, not the final typeset article

32. Chelliah R, Choi J-G, Hwang S-B, Park B-J, Daliri EB-M, Kim S-H, Wei S, Ramakrishnan SR, Oh D-H. *In vitro* and *in vivo* defensive effect of probiotic LAB against *Pseudomonas aeruginosa* using *Caenorhabditis elegans* model. *Virulence* (2018) **9**:1489–1507. doi:10.1080/21505594.2018.1518088

33. Garsin DA, Sifri CD, Mylonakis E, Qin X, Singh K V., Murray BE, Calderwood SB, Ausubel FM. A simple model host for identifying Gram-positive virulence factors. *Proc Natl Acad Sci* (2001) **98**:10892–10897. doi:10.1073/pnas.191378698

34. Park MR, Ryu S, Maburutse BE, Oh NS, Kim SH, Oh S, Jeong SY, Jeong DY, Oh S, Kim Y. Probiotic *Lactobacillus fermentum* strain JDFM216 stimulates the longevity and immune response of *Caenorhabditis elegans* through a nuclear hormone receptor. *Sci Rep* (2018) **8**:7441. doi:10.1038/s41598-018-25333-8

35. Sim I, Park KT, Kwon G, Koh JH, Lim YH. Probiotic potential of *Enterococcus faecium* isolated from chicken cecum with immunomodulating activity and promoting longevity in *Caenorhabditis elegans*. *J Microbiol Biotechnol* (2018) **28**:883–892. doi:10.4014/jmb.1802.02019

36. Heo J, Shin D, Chang SY, Bogere P, Park MR, Ryu S, Lee WJ, Yun B, Lee HK, Kim Y, et al. Comparative Genome Analysis and Evaluation of Probiotic Characteristics of *Lactobacillus plantarum* Strain JDFM LP11. *Korean J food Sci Anim Resour* (2018) **38**:878–888. doi:10.5851/kosfa.2018.e21

37. Kamaladevi A, Balamurugan K. *Lactobacillus casei* triggers a TLR mediated RACK-1 dependent p38 MAPK pathway in *Caenorhabditis elegans* to resist *Klebsiella pneumoniae* infection. *Food Funct* (2016) **7**:3211–3223. doi:10.1039/C6FO00510A

38. Rijkers GT, Bengmark S, Enck P, Haller D, Herz U, Kalliomaki M, Kudo S, Lenoir-Wijnkoop I, Mercenier A, Myllyluoma E, et al. Guidance for Substantiating the Evidence for Beneficial Effects of Probiotics: Current Status and Recommendations for Future Research. *J Nutr* (2010) **140**:671S-676S. doi:10.3945/jn.109.113779

39. Swanson PA, Kumar A, Samarin S, Vijay-Kumar M, Kundu K, Murthy N, Hansen J, Nusrat A, Neish AS. Enteric commensal bacteria potentiate epithelial restitution via reactive oxygen species-mediated inactivation of focal adhesion kinase phosphatases. *Proc Natl Acad Sci* (2011) **108**:8803–8808. doi:10.1073/pnas.1010042108

40. Hooper L V., Littman DR, Macpherson AJ. Interactions Between the Microbiota and the Immune System. *Science (80-)* (2012) **336**:1268–1273. doi:10.1126/science.1223490

41. Spor A, Koren O, Ley R. Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. *Nat Rev Microbiol* (2011) **9**:279–290. doi:10.1038/nrmicro2540

42. Kostic AD, Howitt MR, Garrett WS. Exploring host-microbiota interactions in animal models and humans. *Genes Dev* (2013) **27**:701–718. doi:10.1101/gad.212522.112

43. Chung H, Pamp SJ, Hill JA, Surana NK, Edelman SM, Troy EB, Reading NC, Villablanca EJ, Wang S, Mora JR, et al. Gut immune maturation depends on colonization with a host-specific microbiota. *Cell* (2012) **149**:1578–93. doi:10.1016/j.cell.2012.04.037

44. Arrieta M-C, Walter J, Finlay BB. Human Microbiota-Associated Mice: A Model with Challenges. *Cell Host Microbe* (2016) **19**:575–8. doi:10.1016/j.chom.2016.04.014

45. Hardin-Pouzet H, Morosan S. Des souris, des rats et des hommes. *médecine/sciences* (2019) **35**:479–482. doi:10.1051/medsci/2019082

46. Lee JG, Sung YH, Baek I-J. Generation of genetically-engineered animals using engineered endonucleases. *Arch Pharm Res* (2018) **41**:885–897. doi:10.1007/s12272-018-1037-z

47. Li M, Lee K, Hsu M, Nau G, Mylonakis E, Ramratnam B. *Lactobacillus*-derived extracellular vesicles enhance host immune responses against vancomycin-resistant enterococci. *BMC Microbiol* (2017) **17**: doi:10.1186/s12866-017-0977-7

48. Duncker SC, Kamiya T, Wang L, Yang P, Bienenstock J. Probiotic *Lactobacillus reuteri* Alleviates the Response to Gastric Distension in Rats. *J Nutr* (2011) **141**:1813–1818. doi:10.3945/jn.110.136689

49. Plaza-Díaz J, Robles-Sánchez C, Abadía-Molina F, Sáez-Lara MJ, Vilchez-Padial LM, Gil Á, Gómez-Llorente C, Fontana L. Gene expression profiling in the intestinal mucosa of obese rats administered probiotic bacteria. *Sci data* (2017) **4**:170186. doi:10.1038/sdata.2017.186

50. Fukui H, Oshima T, Tanaka Y, Oikawa Y, Makizaki Y, Ohno H, Tomita T, Watari J, Miwa H. Effect of probiotic *Bifidobacterium bifidum* G9-1 on the relationship between gut microbiota profile and stress sensitivity in maternally separated rats. *Sci Rep* (2018) **8**:12384. doi:10.1038/s41598-018-30943-3

51. Mazloom K, Siddiqi I, Covasa M. Probiotics: How Effective Are They in the Fight against Obesity? *Nutrients* (2019) **11**: doi:10.3390/nu11020258

52. Tong C, Li P, Wu NL, Yan Y, Ying Q-L. Production of p53 gene knockout rats by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature* (2010) **467**:211–213. doi:10.1038/nature09368

53. Li D, Qiu Z, Shao Y, Chen Y, Guan Y, Liu M, Li Y, Gao N, Wang L, Lu X, et al. Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol* (2013) **31**:681–683. doi:10.1038/nbt.2661

54. Ericsson AC. The use of non-rodent model species in microbiota studies. *Lab Anim* (2019) **53**:259–270. doi:10.1177/0023677219834593

55. Rawls JF, Mahowald MA, Ley RE, Gordon JI. Reciprocal Gut Microbiota Transplants from Zebrafish and Mice to Germ-free Recipients Reveal Host Habitat Selection. *Cell* (2006) **127**:423–433. doi:10.1016/j.cell.2006.08.043

56. Roeselers G, Mittge EK, Stephens WZ, Parichy DM, Cavanaugh CM, Guillemin K, Rawls JF. Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish. *ISME J* (2011) **5**:1595–1608. doi:10.1038/ismej.2011.38

57. Russell WM., Burch RL. *The Principles of Humane Experimental Technique*. Wheathampstead: London: Universities Federation for Animal Welfare (1959). Available at:

This is a provisional file, not the final typeset article

http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/het-toc [Accessed July 18, 2019]

58. Richmond J. The 3Rs - Past, Present and Future. *Scand J Lab Anim Sci* (2000) **27**:84–92.

59. Lemaitre B, Hoffmann J. The Host Defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol* (2007) **25**:697–743. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141615

60. Apidianakis Y, Rahme LG. *Drosophila melanogaster* as a model for human intestinal infection and pathology. *Dis Model Mech* (2011) **4**:21–30. doi:10.1242/dmm.003970

61. Koyle ML, Veloz M, Judd AM, Wong AC-N, Newell PD, Douglas AE, Chaston JM. Rearing the Fruit Fly *Drosophila melanogaster* Under Axenic and Gnotobiotic Conditions. *J Vis Exp* (2016) doi:10.3791/54219

62. Blum JE, Fischer CN, Miles J, Handelsman J. Frequent replenishment sustains the beneficial microbiome of *Drosophila melanogaster*. *MBio* (2013) **4**:e00860-13. doi:10.1128/mBio.00860-13

63. Erkosar B, Storelli G, Defaye A, Leulier F. Host-Intestinal Microbiota Mutualism: "Learning on the Fly." *Cell Host Microbe* (2013) **13**:8–14. doi:10.1016/j.chom.2012.12.004

64. Chaston JM, Newell PD, Douglas AE. Metagenome-Wide Association of Microbial Determinants of Host Phenotype in *Drosophila melanogaster*. *MBio* (2014) **5**:e01631-14. doi:10.1128/MBIO.01631-14

65. Trinder M, Daisley BA, Dube JS, Reid G. *Drosophila melanogaster* as a high-throughput model for host-microbiota interactions. *Front Microbiol* (2017) **8**:1–8. doi:10.3389/fmicb.2017.00751

66. Gómez E, Martín F, Nogacka AM, Salazar N, Aláez L, Alcorta E, Gueimonde M, De los Reyes-Gavilán CG. Impact of probiotics on development and behaviour in *Drosophila melanogaster* – a potential *in vivo* model to assess probiotics. *Benef Microbes* (2019) **10**:179–188. doi:10.3920/BM2018.0012

67. Nathan S. New to *Galleria mellonella*: Modeling an ExPEC infection. *Virulence* (2014) **5**:371–374. doi:10.4161/viru.28338

68. Ramarao N, Nielsen-Leroux C, Lereclus D. The Insect *Galleria mellonella* as a Powerful Infection Model to Investigate Bacterial Pathogenesis. *J Vis Exp* (2012)e4392. doi:10.3791/4392

69. Mukherjee K, Raju R, Fischer R, Vilcinskas A. "*Galleria Mellonella* as a Model Host to Study Gut Microbe Homeostasis and Brain Infection by the Human Pathogen *Listeria Monocytogenes*," in *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 27–39. doi:10.1007/10_2013_203

70. Fuchs BB, O'Brien E, El Khoury JB, Mylonakis E. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. *Virulence* (2010) **1**:475–482. doi:10.4161/viru.1.6.12985

71. Fallon J, Kelly J, Kavanagh K. "*Galleria mellonella* as a Model for Fungal Pathogenicity Testing," in (Humana Press), 469–485. doi:10.1007/978-1-61779-539-8_33

72. Vilela SF, Barbosa JO, Rossoni RD, Santos JD, Prata MC, Anbinder AL, Jorge AO, Junqueira JC. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 inhibits biofilm formation by *C. albicans* and attenuates the experimental candidiasis in *Galleria mellonella*. *Virulence* (2015) **6**:29–39. doi:10.4161/21505594.2014.981486

73. Jiang H, Wang D. The Microbial Zoo in the *C. elegans* Intestine: Bacteria, Fungi and Viruses. *Viruses* (2018) **10**: doi:10.3390/v10020085

74. Park MR, Yun HS, Son SJ, Oh S, Kim Y. Short communication: Development of a direct *in vivo* screening model to identify potential probiotic bacteria using *Caenorhabditis elegans*. *J Dairy Sci* (2014) **97**:6828–34. doi:10.3168/jds.2014-8561

75. Lee HK, Choi S-H, Lee CR, Lee SH, Park MR, Kim Y, Lee M-K, Kim G-B. Screening and Characterization of Lactic Acid Bacteria Strains with Anti-inflammatory Activities through *in vitro* and *Caenorhabditis elegans* Model Testing. *Korean J food Sci Anim Resour* (2015) **35**:91–100. doi:10.5851/kosfa.2015.35.1.91

76. Schifano E, Zinno P, Guantario B, Roselli M, Marcoccia S, Devirgiliis C, Uccelletti D. The Foodborne Strain *Lactobacillus fermentum* MBC2 Triggers *pept-1*-Dependent Pro-Longevity Effects in *Caenorhabditis elegans*. *Microorganisms* (2019) **7**:45. doi:10.3390/microorganisms7020045

77. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward W, Prasher D. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science (80-)* (1994) **263**:802–805. doi:10.1126/science.8303295

78. Jeon H, Cha DS. Anti-aging properties of *Ribes fasciculatum* in *Caenorhabditis elegans*. *Chin J Nat Med* (2016) **14**:335–42. doi:10.3724/SP.J.1009.2016.00335

79. Cassidy L, Petersen C, Treitz C, Dierking K, Schulenburg H, Leippe M, Tholey A. The *Caenorhabditis elegans* Proteome Response to Naturally Associated Microbiome Members of the Genus *Ochrobactrum*. *Proteomics* (2018) **18**:1700426. doi:10.1002/pmic.201700426

80. White C V., Herman MA. Transcriptomic, Functional, and Network Analyses Reveal Novel Genes Involved in the Interaction Between *Caenorhabditis elegans* and *Stenotrophomonas maltophilia*. *Front Cell Infect Microbiol* (2018) **8**:266. doi:10.3389/fcimb.2018.00266

81. Sharika R, Subbaiah P, Balamurugan K. Studies on reproductive stress caused by candidate Gram positive and Gram negative bacteria using model organism, *Caenorhabditis elegans*. *Gene* (2018) **649**:113–126. doi:10.1016/J.GENE.2018.01.088

82. Yang W, Dierking K, Esser D, Tholey A, Leippe M, Rosenstiel P, Schulenburg H. Overlapping and unique signatures in the proteomic and transcriptomic responses of the nematode *Caenorhabditis elegans* toward pathogenic *Bacillus thuringiensis*. *Dev Comp Immunol* (2015) **51**:1–9. doi:10.1016/j.dci.2015.02.010

83. Park H-EH, Jung Y, Lee S-J V. Survival assays using *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cells* (2017) **40**:90–99. doi:10.14348/molcells.2017.0017

This is a provisional file, not the final typeset article

84. Ikeda T, Yasui C, Hoshino K, Arikawa K, Nishikawa Y. Influence of lactic acid bacteria on longevity of *Caenorhabditis elegans* and host defense against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Appl Environ Microbiol* (2007) **73**:6404–6409. doi:10.1128/AEM.00704-07

85. Lenaerts I, Walker GA, Van Hoorebeke L, Gems D, Vanfleteren JR. Dietary restriction of *Caenorhabditis elegans* by axenic culture reflects nutritional requirement for constituents provided by metabolically active microbes. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* (2008) **63**:242–52. doi:10.1093/gerona/63.3.242

86. Nakagawa H, Shiozaki T, Kobatake E, Hosoya T, Moriya T, Sakai F, Taru H, Miyazaki T. Effects and mechanisms of prolongevity induced by *Lactobacillus gasseri* SBT2055 in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* (2016) **15**:227–236. doi:10.1111/acel.12431

87. Kato M, Hamazaki Y, Sun S, Nishikawa Y, Kage-Nakadai E. *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588 Increases the Lifespan and Multiple-Stress Resistance of *Caenorhabditis elegans*. *Nutrients* (2018) **10**:1921. doi:10.3390/nu10121921

88. Kwon G, Lee J, Lim Y-H. Dairy *Propionibacterium* extends the mean lifespan of *Caenorhabditis elegans* via activation of the innate immune system. *Sci Rep* (2016) **6**:31713. doi:10.1038/srep31713

89. Sharma K, Pooranachithra M, Balamurugan K, Goel G. Probiotic mediated colonization resistance against *E.coli* infection in experimentally challenged *Caenorhabditis elegans*. *Microb Pathog* (2019) **127**:39–47. doi:10.1016/j.micpath.2018.11.041

90. Poupet C, Saraoui T, Veisseire P, Bonnet M, Dausset C, Gachinat M, Camarès O, Chassard C, Nivoliez A, Bornes S. *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35 as an effective treatment for preventing *Candida albicans* infection in the invertebrate model *Caenorhabditis elegans*: First mechanistic insights. *PLoS One* (2019) **14**:e0216184. doi:10.1371/journal.pone.0216184

91. Wang S, Ahmadi S, Nagpal R, Jain S, Mishra SP, Kavanagh K, Zhu X, Wang Z, McClain DA, Kritchevsky SB, et al. Lipoteichoic acid from the cell wall of a heat killed *Lactobacillus paracasei* D3-5 ameliorates aging-related leaky gut, inflammation and improves physical and cognitive functions: from *C. elegans* to mice. *GeroScience* (2019) doi:10.1007/s11357-019-00137-4

92. Komura T, Ikeda T, Yasui C, Saeki S, Nishikawa Y. Mechanism underlying prolongevity induced by bifidobacteria in *Caenorhabditis elegans*. *Biogerontology* (2013) **14**:73–87. doi:10.1007/s10522-012-9411-6

93. Zhao L, Zhao Y, Liu R, Zheng X, Zhang M, Guo H, Zhang H, Ren F. The transcription factor DAF-16 is essential for increased longevity in *C. elegans* Exposed to *Bifidobacterium longum* BB68. *Sci Rep* (2017) **7**:7408. doi:10.1038/s41598-017-07974-3

94. Mooijaart SP, Brandt BW, Baldal EA, Pijpe J, Kuningas M, Beekman M, Zwaan BJ, Slagboom PE, Westendorp RGJ, Van Heemst D. *C. elegans* DAF-12, Nuclear Hormone Receptors and human longevity and disease at old age. *Ageing Res Rev* (2005) **4**:351–371. doi:10.1016/j.arr.2005.03.006

95. Sun S, Mizuno Y, Komura T, Nishikawa Y, Kage-Nakadai E. Toll-like receptor homolog TOL-1 regulates *Bifidobacterium infantis*-elicited longevity and behavior in *Caenorhabditis elegans*. *Biosci Microbiota, Food Heal* (2019) **38**:105–110. doi:10.12938/bmfh.18-031

96. Halaschek-Wiener J, Khattra JS, McKay S, Pouzyrev A, Stott JM, Yang GS, Holt RA, Jones SJM, Marra MA, Brooks-Wilson AR, et al. Analysis of long-lived *C. elegans* daf-2 mutants using serial analysis of gene expression. *Genome Res* (2005) **15**:603–615. doi:gr.3274805 [pii] 10.1101/gr.3274805

97. Hsu A-L. Regulation of Aging and Age-Related Disease by DAF-16 and Heat-Shock Factor. (2003). doi:10.1126/science.1083701

98. Fasseas MK, Fasseas C, Mountzouris KC, Syntichaki P. Effects of *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus reuteri*, and *Pediococcus acidilactici* on the nematode *Caenorhabditis elegans* include possible antitumor activity. *Appl Microbiol Biotechnol* (2013) **97**:2109–2118. doi:10.1007/s00253-012-4357-9

99. Sugawara T, Sakamoto K. Killed *Bifidobacterium longum* enhanced stress tolerance and prolonged life span of *Caenorhabditis elegans* via DAF-16. *Br J Nutr* (2018) **120**:872–880. doi:10.1017/S0007114518001563

100. Francis R, Barton MK, Kimble J, Schedl T. *gld-1*, a tumor suppressor gene required for oocyte development in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* (1995) **139**:579–606. doi:10.1016/0148-9062(91)90340-R

101. Zhong L, Zhang X, Covasa M. Emerging roles of lactic acid bacteria in protection against colorectal cancer. *World J Gastroenterol* (2014) **20**:7878. doi:10.3748/wjg.v20.i24.7878

102. Tarrah A, De Castilhos J, Rossi RC, Da Silva Duarte V, Ziegler DR, Corich V, Giacomini A. *In vitro* probiotic potential and anti-cancer activity of newly isolated folate-producing <i>streptococcus thermophilus<i> strains. *Front Microbiol* (2018) **9**:2214. doi:10.3389/fmicb.2018.02214

103. Kwon G, Lee J, Koh J-H, Lim Y-H. Lifespan Extension of *Caenorhabditis elegans* by *Butyricicoccus pullicaecorum* and *Megasphaera elsdenii* with Probiotic Potential. *Curr Microbiol* (2018) **75**:557–564. doi:10.1007/s00284-017-1416-6

104. Veisseire P, Bonnet M, Saraoui T, Poupet C, Camar O, Gachinat M, Callon C, Febvre G, Chassard C. Investigation into In Vitro and In Vivo *Caenorhabditis elegans* Models to Select Cheese Yeasts as Probiotic Candidates for their Preventive E ff ects against *Salmonella Typhimurium*. *Microorganisms* (2020) **8**:

105. Fontana L, Partridge L, Longo VD. Extending Healthy Life Span--From Yeast to Humans. *Science (80-)* (2010) **328**:321–326. doi:10.1126/science.1172539

106. Kenyon CJ. The genetics of ageing. *Nature* (2010) **464**:504–512. doi:10.1038/nature08980

107. Ewald CY, Castillo-Quan JI, Blackwell TK. Untangling Longevity, Dauer, and Healthspan in *Caenorhabditis elegans* Insulin/IGF-1-Signalling. *Gerontology* (2018) **64**:96–104. doi:10.1159/000480504

This is a provisional file, not the final typeset article

108. Murphy CT, Hu PJ. Insulin/insulin-life growth factor signaling in *C. elegans*. *WormBook* (2013)1–30. doi:10.1895/wormbook.1.

109. Xu A, Shi G, Liu F, Ge B. *Caenorhabditis elegans* mom-4 is required for the activation of the p38 MAPK signaling pathway in the response to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Protein Cell* (2013) **4**:53–61. doi:10.1007/s13238-012-2080-z

110. Troemel ER, Chu SW, Reinke V, Lee SS, Ausubel FM, Kim DH. p38 MAPK regulates expression of immune response genes and contributes to longevity in *C. elegans*. *PLoS Genet* (2006) **2**:1725–1739. doi:10.1371/journal.pgen.0020183

111. Neumann-Haefelin E, Qi W, Finkbeiner E, Walz G, Baumeister R, Hertweck M. SHC-1/p52Shc targets the insulin/IGF-1 and JNK signaling pathways to modulate life span and stress response in *C. elegans*. *Genes Dev* (2008) **22**:2721–2735. doi:10.1101/gad.478408

112. Wolf M, Nunes F, Henkel A, Heinick A, Paul RJ. The MAP kinase JNK-1 of *Caenorhabditis elegans*: Location, activation, and influences over temperature-dependent insulin-like signaling, stress responses, and fitness. *J Cell Physiol* (2008) **214**:721–729. doi:10.1002/jcp.21269

113. Oh SW, Mukhopadhyay A, Svrzikapa N, Jiang F, Davis RJ, Tissenbaum HA. JNK regulates lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulating nuclear translocation of forkhead transcription factor/DAF-16. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2005) **102**:4494–9. doi:10.1073/pnas.0500749102

114. Donato V, Ayala FR, Cogliati S, Bauman C, Costa JG, Leñini C, Grau R. *Bacillus subtilis* biofilm extends *Caenorhabditis elegans* longevity through downregulation of the insulin-like signalling pathway. *Nat Commun* (2017) **8**:14332. doi:10.1038/ncomms14332

115. Gusarov I, Gautier L, Smolentseva O, Shamovsky I, Eremina S, Mironov A, Nudler E. Bacterial nitric oxide extends the lifespan of *C. elegans*. *Cell* (2013) **152**:818–830. doi:10.1016/j.cell.2012.12.043

116. Clark LC, Hodgkin J. Commensals, probiotics and pathogens in the *Caenorhabditis elegans* model. *Cell Microbiol* (2014) **16**:27–38. doi:10.1111/cmi.12234

117. Rasamiravaka T, Vandeputte OM, Pottier L, Huet J, Rabemanantsoa C, Kiendrebeogo M, Andriantsimahavandy A, Rasamindrakotroka A, Stévigny C, Duez P, et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and persistence, along with the production of quorum sensing-dependent virulence factors, are disrupted by a triterpenoid coumarate ester isolated from *Dalbergia trichocarpa*, a tropical legume. *PLoS One* (2015) **10**: doi:10.1371/journal.pone.0132791

118. Oh S, Go GW, Mylonakis E, Kim Y. The bacterial signalling molecule indole attenuates the virulence of the fungal pathogen *Candida albicans*. *J Appl Microbiol* (2012) **113**:622–628. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05372.x

119. Williams P. Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology* (2007) **153**:3923–3938. doi:10.1099/mic.0.2007/012856-0

120. Fujiya M, Musch MW, Nakagawa Y, Hu S, Alverdy J, Kohgo Y, Schneewind O, Jabri B, Chang EB. The *Bacillus subtilis* Quorum-Sensing Molecule CSF Contributes to Intestinal Homeostasis via OCTN2, a Host Cell Membrane Transporter. *Cell Host Microbe* (2007) **1**:299–308. doi:10.1016/j.chom.2007.05.004

121. Harman D. Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *J Gerontol* (1956) **11**:298–300. doi:10.1093/geronj/11.3.298

122. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* (2007) **39**:44–84. doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001

123. Labuschagne CF, Stigter ECA, Hendriks MMWB, Berger R, Rokach J, Korswagen HC, Brenkman AB. Quantification of *in vivo* oxidative damage in *Caenorhabditis elegans* during aging by endogenous F3-isoprostane measurement. *Aging Cell* (2013) **12**:214–223. doi:10.1111/acel.12043

124. Ristow M, Schmeisser S. Extending life span by increasing oxidative stress. *Free Radic Biol Med* (2011) **51**:327–336. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.010

125. Southam CM, Ehrlich J. Effects of exact of western red-dedar heartwood on certain wood-decaying fungi in culture. *Phytopathology* (1943) **33**:517–524.

126. Cypser JR, Tedesco P, Johnson TE. Hormesis and aging in *Caenorhabditis elegans*. *Exp Gerontol* (2006) **41**:935–939. doi:10.1016/j.exger.2006.09.004

127. Sasakura H, Moribe H, Nakano M, Ikemoto K, Takeuchi K, Mori I. Lifespan extension by peroxidase and dual oxidase-mediated ROS signaling through pyrroloquinoline quinone in *C. elegans*. *J Cell Sci* (2017) **130**:2631–2643. doi:10.1242/jcs.202119

128. Li Y, Wei G, Chen J. Glutathione: A review on biotechnological production. *Appl Microbiol Biotechnol* (2004) **66**:233–242. doi:10.1007/s00253-004-1751-y

129. Kobatake E, Nakagawa H, Seki T, Miyazaki T. Protective effects and functional mechanisms of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 against oxidative stress. *PLoS One* (2017) **12**:1–17. doi:10.1371/journal.pone.0177106

130. Clark DA, Gabel C V., Gabel H, Samuel ADT. Temporal Activity Patterns in Thermosensory Neurons of Freely Moving *Caenorhabditis elegans* Encode Spatial Thermal Gradients. *J Neurosci* (2007) **27**:6083–6090. doi:10.1523/JNEUROSCI.1032-07.2007

131. Prahlad V, Cornelius T, Morimoto RI. Regulation of the Cellular Heat Shock Response in *Caenorhabditis elegans* by Thermosensory Neurons. *Science (80-)* (2008) **320**:811–814. doi:10.1126/science.1156093

132. Rangan KJ, Pedicord VA, Wang YC, Kim B, Lu Y, Shaham S, Mucida D, Hang HC. A secreted bacterial peptidoglycan hydrolase enhances tolerance to enteric pathogens. *Science (80-)* (2016) **353**:1434–1437. doi:10.1126/science.aaf3552

133. Engelmann I, Pujol N. Innate immunity in *C.elegans*. *Invertebr Immun* (2010)105–119.

This is a provisional file, not the final typeset article

134. Kim DH. A Conserved p38 MAP Kinase Pathway in *Caenorhabditis elegans* Innate Immunity. *Science (80-)* (2002) **297**:623–626. doi:10.1126/science.1073759

135. Sifri CD, Begun J, Ausubel FM, Calderwood SB. *Caenorhabditis elegans* as a Model Host for *Staphylococcus aureus* Pathogenesis. *Infect Immun* (2003) **71**:2208. doi:10.1128/IAI.71.4.2208

136. Huffman DL, Abrami L, Sasik R, Corbeil J, van der Goot FG, Aroian R V. Mitogen-activated protein kinase pathways defend against bacterial pore-forming toxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2004) **101**:10995–1000. doi:10.1073/pnas.0404073101

137. Evans EA, Chen WC, Tan MW. The DAF-2 insulin-like signaling pathway independently regulates aging and immunity in *C. elegans*. *Aging Cell* (2008) **7**:879–893. doi:10.1111/j.1474-9726.2008.00435.x

138. Wang Y, Jian F, Wu J, Wang S. Stress-Response Protein Expression and DAF-16 Translocation were Induced in Tributyltin-Exposed *Caenorhabditis elegans*. *Bull Environ Contam Toxicol* (2012) **89**:704–711. doi:10.1007/s00128-012-0760-2

139. Morrison DK. MAP kinase pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol* (2012) **4**: doi:10.1101/cshperspect.a011254

140. Pukkila-Worley R, Ausubel FM, Mylonakis E. *Candida albicans* infection of *Caenorhabditis elegans* induces antifungal immune defenses. *PLoS Pathog* (2011) **7**: doi:10.1371/journal.ppat.1002074

141. Peterson ND, Cheesman HK, Liu P, Anderson SM, Foster KJ, Chhaya R, Perrat P, Thekkiniath J, Yang Q, Haynes CM, et al. The nuclear hormone receptor NHR-86 controls anti-pathogen responses in *C. elegans*. *PLoS Genet* (2019) **15**:e1007935. doi:10.1371/journal.pgen.1007935

142. Son SJ, Park MR, Ryu SD, Maburutse BE, Oh NS, Park J, Oh S, Kim Y. Short communication: In vivo screening platform for bacteriocins using Caenorhabditis elegans to control mastitis-causing pathogens. *J Dairy Sci* (2016) **99**:8614–8621. doi:10.3168/jds.2016-11330

143. Coolon JD, Jones KL, Todd TC, Carr BC, Herman MA. *Caenorhabditis elegans* Genomic Response to Soil Bacteria Predicts Environment-Specific Genetic Effects on Life History Traits. *PLoS Genet* (2009) **5**:e1000503. doi:10.1371/journal.pgen.1000503

144. MacNeil LT, Watson E, Arda HE, Zhu LJ, Walhout AJM. Diet-induced developmental acceleration independent of TOR and insulin in *C. elegans*. *Cell* (2013) **153**:240–252. doi:10.1016/j.cell.2013.02.049

145. Portal-Celhay C, Bradley ER, Blaser MJ. Control of intestinal bacterial proliferation in regulation of lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *BMC Microbiol* (2012) **12**:49. doi:10.1186/1471-2180-12-49

146. Millet ACM, Ewbank JJ. Immunity in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Opin Immunol* (2004) **16**:4–9. doi:10.1016/j.coi.2003.11.005

147. Kim J, Moon Y. Worm-based alternate assessment of probiotic intervention against gut barrier infection. *Nutrients* (2019) **11**:1–13. doi:10.3390/nu11092146

148. Tan K, Deng D, Ma X, Cui Y, Tian Z. Pediococcus acidilactici P25 Protected Caenorhabditis elegans against Enterotoxigenic Escherichia coli K88 Infection and Transcriptomic Analysis of Its Potential Mechanisms. *Biomed Res Int* (2020) **2020**: doi:10.1155/2020/7340312

149. Chelliah R, Saravanakumar K, Daliri EBM, Kim JH, Lee JK, Jo H yeong, Kim SH, Ramakrishnan SR, Madar IH, Wei S, et al. Unveiling the potentials of bacteriocin (Pediocin L50) from *Pediococcus acidilactici* with antagonist spectrum in a *Caenorhabditis elegans* model. *Int J Biol Macromol* (2019) **143**:555–572. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.10.196

150. Poupet C, Veisseire P, Bonnet M, Camarès O, Gachinat M, Dausset C, Chassard C, Nivoliez A, Bornes S. Curative Treatment of Candidiasis by the Live Biotherapeutic Microorganism *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35® in the Invertebrate Model *Caenorhabditis elegans*: First Mechanistic Insights. *Microorg 2020, Vol 8, Page 34* (2019) **8**:34. doi:10.3390/MICROORGANISMS8010034

151. de Barros PP, Scorzoni L, Ribeiro F de C, Fugisaki LR de O, Fuchs BB, Mylonakis E, Jorge AOC, Junqueira JC, Rossoni RD. *Lactobacillus paracasei* 28.4 reduces *in vitro* hyphae formation of *Candida albicans* and prevents the filamentation in an experimental model of *Caenorhabditis elegans*. *Microb Pathog* (2018) **117**:80–87. doi:10.1016/j.micpath.2018.02.019

152. Rousseau V. Evaluation d'oligosaccharides à effet prébiotique vis-à-vis de la microflore vaginale. (2004) Available at: http://eprint.insa-toulouse.fr/archive/00000069/ [Accessed June 14, 2016]

153. Nivoliez A, Camares O, Paquet-Gachinat M, Bornes S, Forestier C, Veisseire P. Influence of manufacturing processes on *in vitro* properties of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35®. *J Biotechnol* (2012) **160**:236–241. doi:10.1016/j.jbiotec.2012.04.005

154. Sharma K, Pooranachithra M, Balamurugan K, Goel G. Multivariate Analysis of Increase in Life Span of *Caenorhabditis elegans* Through Intestinal Colonization by Indigenous Probiotic Strains. *Probiotics Antimicrob Proteins* (2018)1–9. doi:10.1007/s12602-018-9420-0

155. Zhou M, Yu H, Yin X, Sabour PM, Chen W, Gong J. *Lactobacillus zeae* protects *Caenorhabditis elegans* from enterotoxigenic *Escherichia coli*-caused death by inhibiting enterotoxin gene expression of the pathogen. *PLoS One* (2014) **9**: doi:10.1371/journal.pone.0089004

156. Neuhaus K, Lamparter MC, Zölch B, Landstorfer R, Simon S, Spanier B, Ehrmann MA, Vogel RF. Probiotic *Enterococcus faecalis* Symbioflor® down regulates virulence genes of EHEC *in vitro* and decrease pathogenicity in a *Caenorhabditis elegans* model. *Arch Microbiol* (2017) **199**:203–213. doi:10.1007/s00203-016-1291-8

157. Kim Y, Han KS, Imm JY, Oh S, You S, Park S, Kim SH. Inhibitory effects of *Lactobacillus acidophilus* lysates on the cytotoxic activity of shiga-like toxin 2 produced from *Escherichia coli* O157:H7. *Lett Appl Microbiol* (2006) **43**:502–507. doi:10.1111/j.1472-765X.2006.02005.x

This is a provisional file, not the final typeset article

158. Chou T-C, Chiu H-C, Kuo C-J, Wu C-M, Syu W-J, Chiu W-T, Chen C-S. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Shiga-like toxin 1 is required for full pathogenicity and activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Microbiol* (2013) **15**:82–97. doi:10.1111/cmi.12030

159. Komura T, Yasui C, Miyamoto H, Nishikawa Y. *Caenorhabditis elegans* as an alternative model host for *Legionella pneumophila*, and protective effects of *Bifidobacterium infantis*. *Appl Environ Microbiol* (2010) **76**:4105–4108. doi:10.1128/AEM.03021-09

160. Kim Y, Mylonakis E. *Caenorhabditis elegans* immune conditioning with the probiotic bacterium *Lactobacillus acidophilus* strain ncfm enhances gram-positive immune responses. *Infect Immun* (2012) **80**:2500–2508. doi:10.1128/IAI.06350-11

161. Silverman GA, Luke CJ, Bhatia SR, Long OS, Vetica AC, Perlmutter DH, Pak SC. Modeling molecular and cellular aspects of human disease using the nematode Caenorhabditis elegans. *Pediatr Res* (2009) **65**:10–18. doi:10.1203/PDR.0b013e31819009b0

162. O'Kane CJ. Modelling human diseases in Drosophila and Caenorhabditis. *Semin Cell Dev Biol* (2003) **14**:3–10. doi:10.1016/S1084-9521(02)00162-3

163. Schmidt EE, Davies CJ. The origins of polypeptide domains. *BioEssays* (2007) **29**:262–270. doi:10.1002/bies.20546

164. Apfeld J, Alper S. "What can we learn about human disease from the nematode C. Elegans?," in *Methods in Molecular Biology* (Humana Press Inc.), 53–75. doi:10.1007/978-1-4939-7471-9_4

165. Ausubel FM. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat Immunol* (2005) **6**:973–979. doi:10.1038/ni1253

166. Kim DH, Ausubel FM. Evolutionary perspectives on innate immunity from the study of Caenorhabditis elegans. *Curr Opin Immunol* (2005) **17**:4–10. doi:10.1016/j.coi.2004.11.007

167. Long X, Spycher C, Han ZS, Rose AM, Müller F, Avruch J. TOR deficiency in C. elegans causes developmental arrest and intestinal atrophy by inhibition of mRNA translation. *Curr Biol* (2002) **12**:1448–1461. doi:10.1016/S0960-9822(02)01091-6

168. Leulier F, MacNeil LT, Lee W jae, Rawls JF, Cani PD, Schwarzer M, Zhao L, Simpson SJ. Integrative Physiology: At the Crossroads of Nutrition, Microbiota, Animal Physiology, and Human Health. *Cell Metab* (2017) **25**:522–534. doi:10.1016/j.cmet.2017.02.001

169. Chen Y-W, Ko W-C, Chen C-S, Chen P-L. Evaluating Virulence and Pathogenesis of *Aeromonas* Infection in a *Caenorhabditis elegans* Model. *J Vis Exp* (2018) doi:10.3791/58768

170. Rouanet A, Bolca S, Bru A, Claes I, Cvejic H, Girgis H, Harper A, Lavergne SN, Mathys S, Pane M, et al. Live Biotherapeutic Products, A Road Map for Safety Assessment. *Front Med* (2020) **7**:237. doi:10.3389/fmed.2020.00237

171. Vázquez-Castellanos JF, Biclot A, Vrancken G, Huys GR, Raes J. Design of synthetic microbial consortia for gut microbiota modulation. *Curr Opin Pharmacol* (2019) **49**:52–59.

doi:10.1016/j.coph.2019.07.005

172. Schulenburg H, Félix MA. The natural biotic environment of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* (2017) **206**:55–86. doi:10.1534/genetics.116.195511

173. Muller C, Mazel V, Dausset C, Busignies V, Bornes S, Nivoliez A, Tchoreloff P. Study of the *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35® properties after compression and proposition of a model to predict tablet stability. *Eur J Pharm Biopharm* (2014) **88**:787–794. doi:10.1016/j.ejpb.2014.07.014

174. Nivoliez A, Veisseire P, Alaterre E, Dausset C, Baptiste F, Camarès O, Paquet-Gachinat M, Bonnet M, Forestier C, Bornes S. Influence of manufacturing processes on cell surface properties of probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35®. *Appl Microbiol Biotechnol* (2015) **99**:399–411. doi:10.1007/s00253-014-6110-z

175. Hwang S-B, Choi J, Wei S, Park B-J, Chelliah R, Oh D-H. *In vivo* screening platform for shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) using *Caenorhabditis elegans* as a model. *PLoS One* (2018) **13**:e0193277. doi:10.1371/journal.pone.0193277

176. Wan L, Lin J, Du H, Zhang Y, Bravo A, Soberón M, Sun M, Peng D. *Bacillus thuringiensis* targets the host intestinal epithelial junctions for successful infection of *Caenorhabditis elegans*. *Environ Microbiol* (2019) **21**:1086–1098. doi:10.1111/1462-2920.14528

177. Gerbaba TK, Gupta P, Rioux K, Hansen D, Buret AG. *Giardia duodenalis* -induced alterations of commensal bacteria kill *Caenorhabditis elegans* : a new model to study microbial-microbial interactions in the gut. *Am J Physiol Liver Physiol* (2015) **308**:G550–G561. doi:10.1152/ajpgi.00335.2014

178. Cruz MR, Graham CE, Gagliano BC, Lorenz MC, Garsin DA. *Enterococcus faecalis* inhibits hyphal morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Infect Immun* (2013) **81**:189–200. doi:10.1128/IAI.00914-12

179. Scanlan LD, Lund SP, Coskun SH, Hanna SK, Johnson ME, Sims CM, Brignoni K, Lapasset P, Petersen EJ, Elliott JT, et al. Counting *Caenorhabditis elegans*: Protocol Optimization and Applications for Population Growth and Toxicity Studies in Liquid Medium. *Sci Rep* (2018) **8**:904. doi:10.1038/s41598-018-19187-3

180. Josende ME, Nunes SM, Müller L, Ferreira-Cravo M, Monserrat JM, Ventura-Lima J. Circular Estimate Method (CEM) - a Simple Method to Estimate *Caenorhabditis elegans* Culture Densities in Liquid Medium. *Biol Proced Online* (2019) **21**:1. doi:10.1186/s12575-018-0089-2

181. Mondal S, Hegarty E, Martin C, Gökçe SK, Ghorashian N, Ben-Yakar A. Large-scale microfluidics providing high-resolution and high-throughput screening of *Caenorhabditis elegans* poly-glutamine aggregation model. *Nat Commun* (2016) **7**:13023. doi:10.1038/ncomms13023

182. Cornwell AB, Llop JR, Salzman P, Thakar J, Samuelson A V. The Replica Set Method: A High-throughput Approach to Quantitatively Measure *Caenorhabditis elegans* Lifespan. *J Vis Exp* (2018) doi:10.3791/57819

This is a provisional file, not the final typeset article

183. Tharmalingam N, Rajmuthiah R, Kim W, Fuchs BB, Jeyamani E, Kelso MJ, Mylonakis E. Antibacterial Properties of Four Novel Hit Compounds from a Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus–Caenorhabditis elegans* High-Throughput Screen. *Microb Drug Resist* (2018) **24**:666–674. doi:10.1089/mdr.2017.0250

184. Kim SM, Escorbar I, Lee K, Fuchs BB, Mylonakis E, Kim W. Anti-MRSA agent discovery using Caenorhabditis elegans-based high-throughput screening. *J Microbiol* (2020) **58**:431–444. doi:10.1007/s12275-020-0163-8

185. Zanni E, Laudenzi C, Schifano E, Palleschi C, Perozzi G, Uccelletti D, Devirgiliis C. Impact of a complex food microbiota on energy metabolism in the model organism *Caenorhabditis elegans*. *Biomed Res Int* (2015) **2015**: doi:10.1155/2015/621709

Table 1: Comparison of vertebrate and invertebrate models used for microorganism – host, microorganism – microorganism and microorganism – microorganism – host interactions. Adapted from Douglas (2018) and Nathan (2014) (7,67).

	Vertebrates models			**Invertebrates models**		
	Mus musculus	***Rattus norvegicus***	***Danio rerio***	***Drosophila melanogaster***	***Galleria mellonella***	***Caenorhabditis elegans***
Full genome sequence available	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Resources needed in the laboratory	Very high	Very high	High	Low	Low	Low to high
Ease of implementation	High	High	Low	Low	Low	Low
Mutants available in public bank	Yes	No	Yes	Yes	No	Yes
RNAi bank available	No	No	No	Yes	No	Yes
Major intestinal taxa	*Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria*	*Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria*	*Proteobacteria, Fusobacteria*	*Lactobacillus, Acetobacter*	No microbiota in laboraroty condition	No microbiota in laboratory condition

	Microorganisms study with *C. elegans*					
Survival at 37 °C (human body temperature)	Yes	Yes	No	No	Yes	No
Immunity	Innate and adaptative	Innate and adaptative	Innate and adaptative	Innate	Innate	Innate
Axenic animals	Yes but technically demanding and very expensive	Yes but technically demanding and very expensive	Yes but limited in time	Yes	Yes	Yes
Compatibility with human origin microorganisms	Variable	Variable	Yes but limited to aerobic taxa	Yes but limited to aerobic taxa	Yes but limited to aerobic taxa	Yes
Screening platform	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes
Usable for high-throughput studies	No	No	Yes	Variable	Yes	Yes
Microscopic observation on live whole animal	No	No	Yes	No	No	Yes
Ethical issues	Yes	Yes	No	No	No	No

	Microorganisms study with *C. elegans*					
Other limitations	Impact of skin, fur, digestive tract and behavior on microbial communities	Impact of skin, fur, digestive tract and behavior on microbial communities Lack of mutants	High variability of the gut microbiota based on experimental and environmental conditions	Low diversity of the gut microbiota High-throughput methods difficult to implement Injecting a pathogen bypasses the early stages of infection	No mutants Low standardization between laboratories	Time consuming without automation Impact of temperature on microbial metabolism

1432

This is a provisional file, not the final typeset article

Table 2: Pathogen—LAB interactions studied in the *C. elegans* intestine.

Kingdoms	Pathogens	LABs	Mechanisms	References
Bacteria	*S. enterica*	*L. helveticus* *L. plantarum* *L. rhamnosus*	Immunotolerance	(84)
		B. infantis *B. longum*	Not described	(132)
		E. faecium	Not described	(35)
	P. aeruginosa	*L. brevis* *P. acidilatici* *P. pentosaceus*	Not described	(32)
	S. aureus	*L. plantarum* *L. zeae* *L. casei* *L. rhamnosus*	Not described	(74)
		L. acidophilus	TIR-1, PMK-1 and BAR-1 pathways	(160)
	E. coli (clinical isolates)	*L. plantarum*	Not described	(154)
		L. paracasei	Not described	(89)
	ETEC	*L. zeae* *L. casei*	Inhibition of *E. coli* virulence	(155)
		L. plantarum *L. rhamnosus*	Not described	(36)
	EHEC	*E. faecalis*	Inhibition of virulence	(156)
		L. acidophilus	Inhibition of virulence	(157)
	L. pneumophila	*B. infantis*	p38 MAPK pathway	(159)
	E. faecalis	*L. acidophilus*	TIR-1, PMK-1 and BAR-1 pathways	(160)
Fungi	*C. albicans*	*L. rhamnosus*	DAF-16 and p38 MAPK pathway	(90,150)
		L. paracasei	Filamentation inhibition	(151)

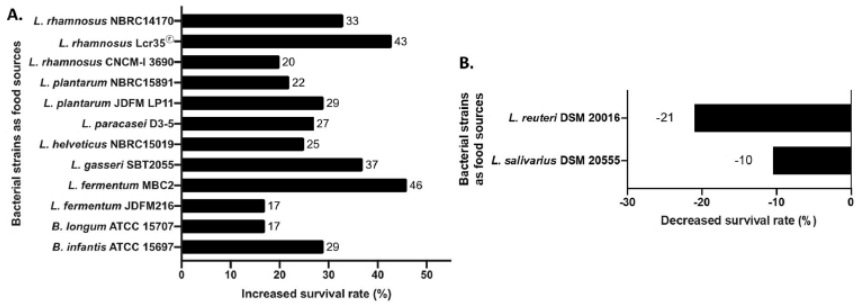
Figure 1: Effects of bacterial probiotic strains on *C. elegans* lifespan. (A) Lifespan of *C. elegans* N2 fed with lactic acid bacteria compared to worms fed with *E. coli* OP50. The increase in the survival rate is represented for each strain as a percentage of the survival rate of *C. elegans* fed on *E. coli* OP50 (11,27,34,36,76,84,89–91). (B) Negative effects of *L. salivarius* and *L. reuteri* on *C. elegans* lifespan. The decrease in the survival rate is represented for each strain as a percentage of the survival rate of *C. elegans* fed on *E. coli* OP50 (98). The decrease in the survival rate is represented for each strain as a percentage of the survival rate of *C. elegans* fed on *E. coli* OP50.

Figure 2: Effects of probiotics *L. gasseri* SBT2055 (86), *L. rhamnosus* CNCM I-3690 (11), *B. longum* (99) and *B. subtilis* NCIB3610 (114) on *C. elegans* during abiotic stress. During oxidative stress, the bacteria induce a response in the host via the p38 MAPK and DAF-2 / DAF-16 pathways allowing the synthesis of antioxidant metabolites. In the case of thermal stress, a neural response induces the synthesis of heat-shock proteins to allow thermotolerance. In both cases, the result is an increase in the longevity of the host.

Figure 3: Molecular interactions and signaling pathways involved in *C. elegans* immune response. In the nematode, three highly conserved signaling pathways are the basis of the immune response protecting the animal from biological and abiotic aggression. These pathways are the p38 MAPK, the DAF-2/Insulin-*like* receptor and the JNK pathways. Interconnections and back-controls exist in these signal cascades and allow for fine control of the defense mechanisms put in place in the face of aggression. Transcriptomic analyses have revealed the absence of overlapping in the expression of genes regulated by these pathways.

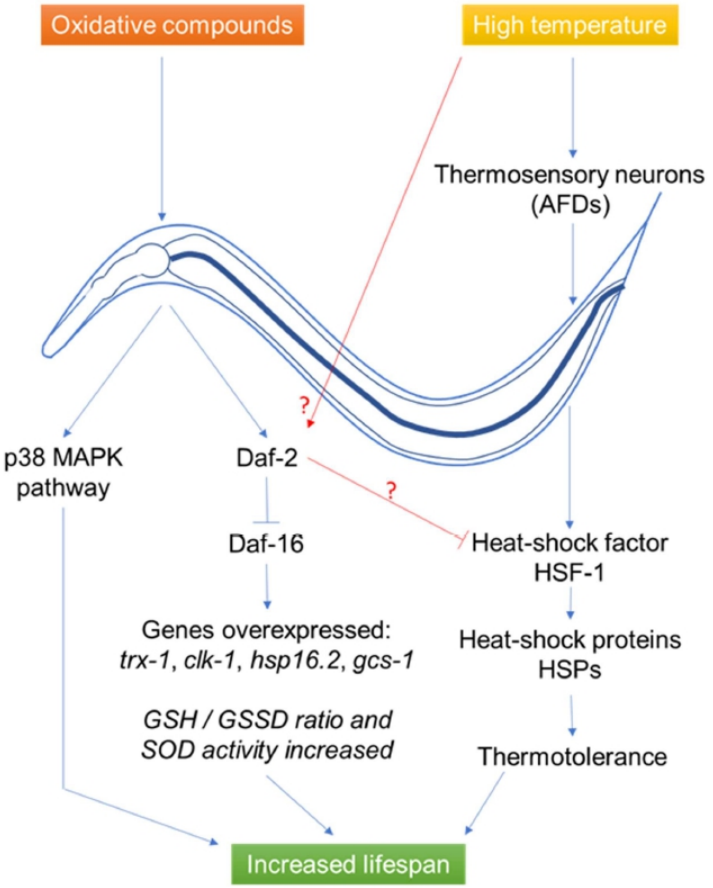
Figure 4: (A) Strategy and workflow for screening, selecting, and studying probiotic microorganisms using an integrated process. A collection of microorganisms of interest must be tested by conventional *in vitro* methods to select strains that meet the eligibility criteria defined in the literature. These candidates are then characterized using the *C. elegans* model to describe their physiological and molecular characteristics to move on to the next steps. These consist of the establishment of preclinical models (i.e. rodents) and then clinical trials in humans before a possible marketing as a drug (or any other galenic form). (B) Manual *C. elegans* analysis workflow representing the numerous steps required by manual experiments. (C) Full automated *C. elegans* analysis workflow allowing a reduction in the number of steps, a reduction in the time required for the experimenter as well as biases inherent in handling errors.

1468 Figure 1



1469

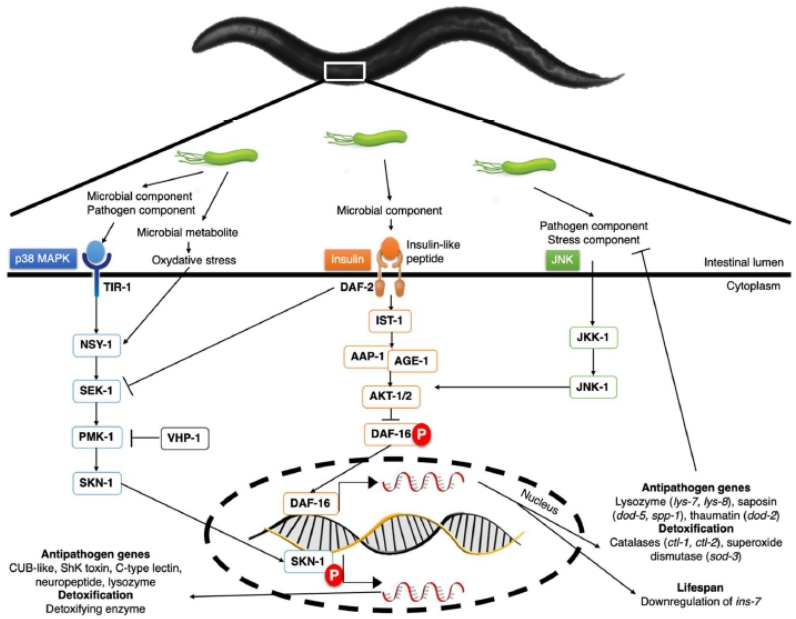
1470 Figure 2



1471

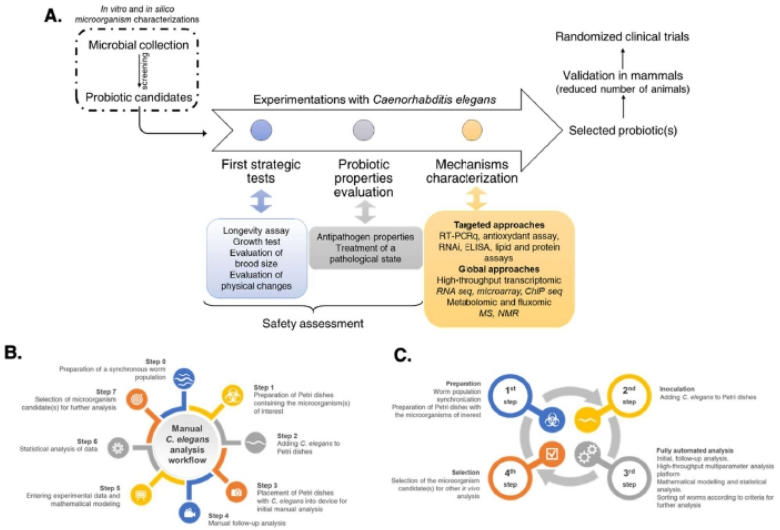
This is a provisional file, not the final typeset article

1472 Figure 3



1473

1474 Figure 4



1475

Annexe 2. Composition des milieux de culture

Bouillon Yeast extract Peptone Glucose (YPG)

Composition pour 1 L de milieu :

- 40 g de glucose
- 5 g d'extrait de levure
- 5 g de peptone
- Eau qsp 1 L

Le pH est ajusté à 6,5. Stérilisation par autoclavage à 110 °C pendant 16 minutes.

Tampon M9

Composition pour 1 L de tampon :

- 3 g de phosphate monopotassique
- 6 g de phosphate dissodique
- 5 g de chlorure de sodium
- 0,25 g de sulfate de magnésium heptahydraté
- Eau distillée qsp 1 L

Stérilisation par autoclavage à 121 °C pendant 20 minutes.

Milieu *Nematode Growth Medium* (NGM)

Base (composition pour 1 L final) :

- 3 g de chlorure de sodium
- 2,5 g de peptone
- 4 g d'extrait de levure
- 17 g d'agar
- 975 mL d'eau distillée

Stérilisation par autoclavage à 121 °C pendant 20 minutes.

Solution de chlorure de calcium à 1 M :

- 5,55 g de chlorure de calcium
- Eau distillée qsp 50 mL

Stérilisation par autoclavage à 121 °C pendant 20 minutes

Solution de sulfate de magnésium à 1 M :

- 6,02 g de sulfate de magnésium
- Eau distillée qsp 50 mL

Solution éthanolique de cholestérol à 5 $mg.mL^{-1}$:

- 0.025 g de cholestérol
- 50 mL d'éthanol absolu

Vortexer jusqu'à complète dissolution. Ne pas autoclaver.

Tampon phosphate 1 M pH = 6 :

- 108,3 g de phosphate monopotassique
- 35,6 g de phosphate dipotassique
- Eau distillée qsp 1 L
- Ajuster à pH = 6

Stérilisation par autoclavage à 121 °C pendant 20 minutes.

Après autoclavage, laisser refroidir le milieu de base et les solutions (sauf le cholestérol) dans un bain marie à 50 °C pendant 1 heure puis ajouter stérilement au milieu de base :

- 1 mL de solution de chlorure de calcium, 1 mL de solution de sulfate de magnésium, 25 mL de tampon phosphate et 1 mL de solution de cholestérol.
- Bien agiter le milieu, le couler en boîtes de Pétri et laisser solidifier à température ambiante.

Solution de fluorodésoxyuridine (FUdR) à 6 mM :

- 0,015 g de FUdR (attention, composé toxique)
- 10 mL de tampon M9 à température ambiante

Vortexer jusqu'à complète dissolution et stériliser sur filtre 0,22 μm.

Ajouter la quantité adéquate de solution dans le milieu afin d'obtenir une concentration finale de 0,12 mM de FUdR.

La solution doit être préparée extemporanément et si possible à l'abri de la lumière, le FUdR étant peu stable en solution.

Annexe 3. Construction bioinformatique des amorces pour le suivi par RT-PCR quantitative de l'expression de gènes

Le programme suivant a été écrit par Jonathan Heuzé, à l'occasion de son stage de deuxième année de DUT Génie Biologique option bioinformatique (année universitaire 2018 – 2019).

```perl
#!/usr/bin/perl
use Bio::DB::GenBank;
use Bio::DB::Query::GenBank;
use Term::ANSIColor;
use Bio::Seq;
use warnings;
use strict;
use Bio::SeqIO;
use Bio::SearchIO;
use Bio::Tools::SeqWords;
use Bio::Tools::Run::StandAloneBlastPlus;
use File::Copy qw/ move mv /;
use Cwd;
use vars qw($opt_h $opt_help $opt_access);
use Getopt::Long;
GetOptions("access" =>\$opt_access,"h" =>\$opt_h, "help" =>\$opt_help,);

if(($opt_access)){
    option_access();
}

if(($opt_h) or ($opt_help)){
    afficher_aide();
}

my (@tabseq, $i, $in, $result, $hit, $hsp,@max,@recup);

print colored("Possédez-vous le numéro d'accession du gène?", 'bold underline white'), "\n";
my $rep=<STDIN>;
chomp ($rep);
if ($rep eq "oui" or $rep eq "OUI"){
    print "\n\n";
    @tabseq=give_seq();
}
if ($rep eq "non" or $rep eq "NON"){
    print "\n";
    print colored("Veuillez entrer le nom du gène sous cette forme:",'bold underline green'),"\n";
    print colored("Le nom de l'organisme est optionnel mais rend la recherche plus précise.",'bold red'),"\n";
    print colored("NomDuGene NomOrganisme",'bold green'),"\n";
    my $query =<STDIN>;
    chomp ($query);
    my @query=split(/\s+/,$query);
    if ($query =~/\w+\s+\w+/){
        $query=join("",$query[0],"[titl]"," AND ",$query[1]," $query[2]","[orgn]");
    }
    elsif ($query =~/\w+/){
        $query=join("",$query[0],"[titl]");
    }

    print "\n";
    my $query_obj = Bio::DB::Query::GenBank->new(-db => 'nucleotide', -query => $query);
    my $gb_obj = Bio::DB::GenBank->new;
    my $stream_obj = $gb_obj->get_Stream_by_query($query_obj);
    print colored("Accession:",'bold white'),"\t";
    print colored("Description:",'bold white'),"\n\n";
    while (my $seq_obj = $stream_obj->next_seq){
        print colored($seq_obj->accession_number(),'bold magenta'),"\t";
        print colored($seq_obj->desc,'bold blue'),"\n";
        print "\t\t";
        print colored("Longueur séquence: ",'bold white');
        print colored($seq_obj->length,'bright_white');
        print colored(" bp",'bright_white'),"\n";
    }
    print "\n";
    @tabseq=give_seq();
}

my $rep_courant = cwd();

mkdir ("/$rep_courant/$tabseq[3]");
mkdir ("/$rep_courant/$tabseq[3]/$tabseq[0]-Fichiers-($tabseq[2])");
print"\n";
@max=amorces($tabseq[0],$tabseq[1],$tabseq[2],$tabseq[3]);
print "\n";
database($tabseq[0]);


sub afficher_aide{
    print "\n","Le programme permet de récupérer la séquence d'un gène par son numéro d'accession, d'en déterminer des couples      d'amorces et de les blaster à une base de données passée en paramètre ou à une base de donnée créée à l'aide du programme.\n\n";
    print "Options:\n"; print colored("[-access]",'bold red'); print " ","Concevoir un fichier contenant des numéros d'accessions",
    "\n\n";
    exit;
}

sub option_access{
    print"\n","Afin de réaliser un fichier contenant des numéros d'accession, il suffit d'ajouter à un document .txt ou à un document vide les numéros d'accession des séquences souhaitées. Il faut écrire les accessions avec un saut de ligne entre chaque, comme suivant:","\n\n","NM_000230","\n","NC_00325","\n","NM_154236","\n","...","\n";
    print colored("Attention ne pas laisser de lignes vides!",'bold red'),"\n\n";
    exit;
}

sub give_seq{
    print colored("Veuillez indiquer le numéro d'accession :",'bold underline green'),"\n";
    my $id=<STDIN>;
    chomp ($id);
    open (F,">Informations_$id.html");
    open (T,">Informations_$id.txt");
    print F "<html><body><pre>";
    my $gb=Bio::DB::GenBank->new();
    my $seq=$gb->get_Seq_by_id("$id");
    my $desc= $seq->desc;
    my $out1=Bio::SeqIO->new (-file=>">$id-$desc.fasta",-format =>"Fasta");
    my $out2= Bio::SeqIO-> new(-file =>">$id-fiche_GenBank.txt",-format=>'GenBank');
    my $out3= Bio::SeqIO-> new(-file =>">$id-$desc.gb",-format=>'GenBank');
    $out1->write_seq($seq);
    $out2->write_seq($seq);
    $out3->write_seq($seq);

    print F "Description: ", $seq->desc, "\n\n"; print T "Description: ", $seq->desc, "\n\n";
    my $fasta_seq=$seq->seq;
    print F "Séquence : \n"; print T "Séquence : \n";
    while ($fasta_seq){
        my $ligne60=substr($fasta_seq,0,60);
        substr($fasta_seq,0,60)="";
        print F "$ligne60\n"; print T "$ligne60\n";
    }
    print F "\n"; print T "\n";
    print F "Longueur de la séquence : ",$seq->length," bp","\n\n"; print T "Longueur de la séquence : ",$seq->length," bp","\n\n";
    my @feat_object=$seq->get_SeqFeatures;
    my $f=$feat_object[0];
    foreach (@feat_object){
        my $primary=$_->primary_tag();
        if ($primary eq "gene"){
            return ($id,$desc,$_->get_tag_values('gene'),$f->get_tag_values('organism'));
        }
    }

    close(F); close(T);

    print "\n\n";
```

```
}


sub amorces{
    print colored("Veuillez indiquer le nombre de couples d'amorces souhaités:",'bold underline green'),"\n";
    print colored("Si vous ne souhaitez pas de couples d'amorces tapez 'exit':",'bold underline green'),"\n";
    my $max=<STDIN>;
    chomp ($max);
    print "\n";
    print colored("Souhaitez-vous réaliser une PCR(fragment >400bp) ou une qPCR(fragment <250bp) ?", 'bold underline white'), "\n";
    my $rep_pcr=<STDIN>;
    chomp ($rep_pcr);
    my $rep_courant = cwd();
    my ($id,$desc,$nom_gene,$organisme)= @_;
    if ($max eq "exit"){
        my @fichier=("$id-$desc.fasta","$id-$desc.gb","$id-fiche_GenBank.txt","Informations_$id.html","Informations_$id.txt");
        push(@fichier,"$organisme/$id-Fichiers-($nom_gene)");
        move_fichiers_dossier(@fichier);
        exit;
    }
    my $in = Bio::SeqIO ->new (-file  => "$id-$desc.fasta",-format => 'Fasta');
    my $k=0;
    open (F,">>Informations_$id.html");
    open (T,">>Informations_$id.txt");
    open(O,">Amorces_$id.fasta");
    my $enter= join("",$nom_gene,"[titl]"," AND ",$organisme,"[orgn]");
    if ($organisme eq "Caenorhabditis elegans"){
        print F "<a href='https://www.wormbase.org/species/c_elegans/gene/$nom_gene' target='_blank'>Lien du gène (WormBase)</a>","\n\n";
    }
    else{
        print F "<a href='https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=search&term=$enter' target='_blank'>Lien du gène (NCBI)</a>","\n\n";
    }

    print F "Amorces optimales pour un fragment ",$rep_pcr," :","\n"; print T "Amorces optimales pour un fragment ",$rep_pcr," :","\n";
    print F '<a href="https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html" target="_blank">Lien pour vérifier les dimères d\'amorces</a>',"\n";
    if($rep_pcr eq "pcr" or $rep_pcr eq "PCR"){
        print colored("Si la longueur de la séquence est inférieure aux fragments de PCR, des fragments plus courts seront déterminés.",'bold red'),"\n";
    }
    while(my $seqobj=$in->next_seq()){
        my $seq1=$seqobj->seq();
        my $seq2=$seqobj->revcom()->seq;
        my $longueur=length($seq1);
        my $f=1;
        my $g=1;
        for (my $i=0;$i<=(length($seq1)-20);$i++){
            my $amorceF=substr($seq1,$i,20); #au début = de 0 à 20 puis de 1 à 21 , de 2 à 22 etc
            my $amorceR=substr($seq2,$i,20);
            my $UC = uc($amorceF);
            my $UC1 = uc($amorceR);
            my $numsGCs = ($UC =~ tr/GC/gc/);
            my $numsATs = ($UC =~ tr/AT/at/);
            my $numsGCs1 = ($UC1 =~ tr/GC/gc/);
            my $numsATs1 = ($UC1 =~ tr/AT/at/);
            my $percentGC = ($numsGCs/20)*100;
            my $percentGC1 = ($numsGCs1/20)*100;
            my $tm=(2*$numsATs)+(4*$numsGCs);
            my $tm1=(2*$numsATs1)+(4*$numsGCs1);
            my $th=$tm-5;
            my $th1=$tm1-5;
            if (($percentGC>=40 && $percentGC<=60) && ($percentGC1>=40 && $percentGC1<=60)){
                my $taillefrag=($longueur-$i)-$i;
                if ($rep_pcr eq "qPCR" or $rep_pcr eq "qpcr"){
                    if ($taillefrag<=250){

                        print_amorces($taillefrag,$amorceF,$i,$tm,$th,$desc,$amorceR,$tm1,$th1,$longueur,$f,$g);
                        $f++; $g++;
                        $k++;
                        if ($k==$max){
                            last;
                        }
                    }
                }
                if ($rep_pcr eq "PCR" or $rep_pcr eq "pcr"){
                    if ($taillefrag>400 && $taillefrag<=1000){

                        print_amorces($taillefrag,$amorceF,$i,$tm,$th,$desc,$amorceR,$tm1,$th1,$longueur,$f,$g);
                        $f++; $g++;
                        $k++;
                        if ($k==$max){
                            last;
                        }

                    }
                    elsif ($taillefrag<400){

                        print_amorces($taillefrag,$amorceF,$i,$tm,$th,$desc,$amorceR,$tm1,$th1,$longueur,$f,$g);
                        $f++; $g++;
                        $k++;
                        if ($k==$max){
                            last;
                        }
                    }
                }

            }
        }
    if ($k==$max){
        last;
    }
    }
    close(F); close(T);
    my @fichier=("$id-$desc.fasta","$id-$desc.gb","$id-fiche_GenBank.txt");
    push(@fichier,"$organisme/$id-Fichiers-($nom_gene)");
    move_fichiers_dossier(@fichier);
    return $max;
}


sub database{
    my ($id)=@_;
    print colored("Voulez-vous créer un fichier base de données pour un blast, ou compléter un fichier existant ? (oui ou non)", 'bold underline white'), "\n";
    my $reponse =<STDIN>;
    chomp ($reponse);
    if ($reponse eq "oui"){
        print "\n"; print colored("Que voulez-vous faire?",'bold underline green'),"\n";
        print colored("Tapez 1",'bold white underline white'); print colored(": pour créer une base de donnée à partir d'un fichier contenant les numéros d'accessions des séquences souhaitées ou en les tapant dans l'invite de commande.",'bold white'),"\n";
        print colored("Tapez 2",'bold white underline white'); print colored(": pour ajouter des séquences à une base de données déjà existante à l'aide d'un fichier contenant les numéros d'accession des séquences souhaitées ou en les tapant dans l'invite de commande.",'bold white'),"\n";
```

```
print colored("Tapez 3",'bold underline white');print colored(": pour ajouter des séquences à une base de données déjà existante à l'aide d'un fichier contenant déjà des séquences enregistrées.",'bold white'),"\n";
my $chiffre=<STDIN>;
chomp $chiffre;
mkdir ('Database');
print "\n";
if ($chiffre==1){
        print colored("Indiquer le nom du fichier contenant le(s) numéro(s) d'accession:",'bold underline green'),"\n";
        my $fichier=<STDIN>;
        chomp ($fichier);
        open (F,"<$fichier");
        my $gb = Bio::DB::GenBank -> new;
        my $out =
        Bio::SeqIO->new(-format=>'fasta',-file=>">$fichier-db.fasta");
        print "\n";
        print colored("Création de la base de données en cours...",'bold white'),"\n";
        while (<F>){
            chomp($_);
            my $seq_obj = $gb->get_Seq_by_acc($_);
            print colored("Description séquence: ",'bold white');
            print colored($seq_obj->desc,'bold blue'),"\n";
            $out->write_seq($seq_obj);
        }
        close(F);

        blast("Amorces_$id.fasta","$fichier-db.fasta","Résultats_Blast_$id.bls");
        print_blast_results($max[0],"Résultats_Blast_$id.bls");
        move_database("$fichier-db");
    }

if ($chiffre==2){
    print colored("Indiquer le fichier base de données à compléter (format fasta);",'bold underline green'),"\n";
    my $fichier10=<STDIN>;
    chomp ($fichier10);
    print "\n";
    print colored("Voulez-vous compléter le fichier:",'bold underline green'),"\n"; print colored("Tapez",'bold underline white'); print colored(" 1:",'bold red underline white'); print colored(" à l'aide d'un fichier contenant des numéros d'accessions.",'bold white'),"\n";
    print colored("Tapez",'bold underline white'); print colored(" 2:",'bold red underline white'); print colored(" en tapant les numéros d'accessions au clavier",'bold white'),"\n";
    my $access=<STDIN>;
    chomp $access;
    open (FILE, ">>$fichier10");
    if($access==1){
        print colored("Indiquer le nom du fichier contenant le(s) numéro(s) d'accession:",'bold underline green'),"\n";
        my $fic1=<STDIN>;
        chomp ($fic1);
        @recup=recup_saisie($fichier10);
        open (F,"<$fic1");
        my $gb = Bio::DB::GenBank -> new;
        print "\n";
        print colored("Ajout des séquences à la base de données existante...",'bold white'),"\n";
        while (<F>){
            chomp($_);
            my $seq_obj = $gb->get_Seq_by_acc($_);
            print FILE ">",$seq_obj->desc,"\n";
            print colored("Description séquence: ",'bold white');
            print colored($seq_obj->desc,'bold blue'),"\n";
            my $fasta_seq= $seq_obj->seq;
            while($fasta_seq){
                my $ligne60=substr($fasta_seq,0,60);
                substr($fasta_seq,0,60)="";
                print FILE $ligne60,"\n";
            }
        }
        close(F);close (FILE);
        blast("Amorces_$id.fasta","$fichier10","Résultats_Blast_$id.bls");
        print_blast_results($max[0],"Résultats_Blast_$id.bls");
        move_database(@recup);
        }

        if($access==2){
            recup_access($fichier10);
        }

    }

    if ($chiffre==3){
        print colored("Indiquer le nom du fichier contenant la/les séquence(s) à ajouté:",'bold underline green'),"\n";
        my $fic2=<STDIN>;
        chomp ($fic2);
        print colored("Indiquer le fichier base de données à compléter (format fasta);",'bold underline green'),"\n";
        my $fic3=<STDIN>;
        chomp ($fic3);
        open (FILE, ">>$fic3");
        open (F,"<$fic2");
        print "\n";
        @recup=recup_saisie($fic3);
        while (<F>){
            if(/^[>]/){
                print FILE $_;
                chomp;
            }
            if ($_ =~/^[^>]/){
                chomp;
                my $ligne60=substr($_,0,60);
                substr($_,0,60)="";
                print FILE $ligne60,"\n";
                chomp;

            }
        }
        close (FILE);
        close (F);
        blast("Amorces_$id.fasta","$fic3","Résultats_Blast_$id.bls");
        print_blast_results($max[0],"Résultats_Blast_$id.bls");
        move_database(@recup);


    }
    }
    if ($reponse eq "non"){
        print "\n";
        print colored("Indiquer le fichier base de donnée pour réaliser le blast (format fasta):",'bold underline green'),"\n";
        my $saisie=<STDIN>;
        chomp ($saisie);
        blast("Amorces_$id.fasta","$saisie","Résultats_Blast_$id.bls");
        print_blast_results($max[0],"Résultats_Blast_$id.bls");
        @recup=recup_saisie($saisie);
        move_database(@recup);
    }

}

sub blast{

    my ($seq, $fic1, $fic2)= @_;
    my ($blastlocal, $result);
      $blastlocal = Bio::Tools::Run::StandAloneBlastPlus->new(
        -db_name => $fic1,
        -db_data => $fic1,
        -create => 1
```

```
      );
      $blastlocal->blastn(  -query => $seq ,-outfile => $fic2, -method_args => [
      -word_size=>10,-num_descriptions=>10,-num_alignments => 10]);
      #num_descriptions permet d'afficher un certains nombre de hits
      #num_alignments permet d'afficher les HSP que pour un certains nombre de hits
      $blastlocal->cleanup;
      my @fichier=("Amorces_$tabseq[0].fasta",);
      push(@fichier,"$tabseq[3]/$tabseq[0]-Fichiers-($tabseq[2])");
      move_fichiers_dossier(@fichier);
      print "\n";
      print colored ("Blast effectué",'bold red'),"\n";


}

sub print_blast_results {
    my ($max,$fichier)=@_;
    my $fic = new Bio::SearchIO(-format => 'blast',-file   => "$fichier");
    my $h=0;
    my $p=0;
    my $k=0;
    open (F,">>Informations_$tabseq[0].html");
    open (T,">>Informations_$tabseq[0].txt");
    print F "Résultats optimaux du BLASTn:","\n\n"; print T "Résultats optimaux du
    BLASTn:","\n\n";
    while( my $result = $fic->next_result ) {
        while( my $hit = $result->next_hit ) {
            #Pour chaque hit on a une série de HSP
            while(my $hsp = $hit->next_hsp) {
                push (my @hsps, $hsp);
                for $hsp ( sort { $a->bits cmp $b->bits } @hsps ) {
                #my @affichage = grep { $_ <10} @hsps;
                if($hsp->length('total')==$hsp->score && $hsp->length('total')==20){
                    print_resume_blast($result,$hit,$hsp);
                    $h++;
                    $p=1;
                    if ($h==$max*2){
                        last;
                    }
                }
                if($p==1){
                    last;
                }
                elsif($hsp->length('total')==$hsp->score &&
                $hsp->length('total')==16){
                    print_resume_blast($result,$hit,$hsp);
                    $k++;
                    if ($k==$max*2){
                    last;
                    }

                }

                }

            }
        }
        if ($h==$max*2){
            last;
        }
        if ($k==$max*2){
            last;
        }

    }
    print F "</pre></body></html>";
    close(F); close(T);
    my
    @fichier=($fichier,"Informations_$tabseq[0].html","Informations_$tabseq[0].txt");
    push(@fichier,"$tabseq[3]/$tabseq[0]-Fichiers-($tabseq[2])");
    move_fichiers_dossier(@fichier);
}


sub recup_access{
    print colored("Veuillez taper les numéros d'accessions des séquences:",'bold
    green'),"\n";
    my $saisie=<STDIN>;
    chomp ($saisie);
    my ($fichier)=@_;
    my @saisie=split(" ",$saisie);
    open (FILE, ">>$fichier");
    my $gb = Bio::DB::GenBank -> new;
    print "\n";
    print colored("Ajout des séquences à la base de données existante...",'bold
    white'),"\n";
    foreach(@saisie){
        chomp($_);
        my $seq_obj = $gb->get_Seq_by_acc($_);
        print FILE ">",$seq_obj->desc,"\n";
        print colored("Description séquence: ",'bold white');
        print colored($seq_obj->desc,'bold blue'),"\n";
        my $fasta_seq= $seq_obj->seq;
        while($fasta_seq){
            my $ligne60=substr($fasta_seq,0,60);
            substr($fasta_seq,0,60)="";
            print FILE $ligne60,"\n";
        }
    }


    close (FILE);
    blast("Amorces_$tabseq[0].fasta","$fichier","Résultats_Blast_$tabseq[0].bls");
    print_blast_results($max[0],"Résultats_Blast_$tabseq[0].bls");
}

sub recup_saisie{
    my ($saisie)=@_;
    my @saisie;
    if ($saisie=~/\w+\/\w+\-*\w+\.*\w+/){
        my @tab1=split(/\//,$saisie);
        my @tab2=split(/\./,$tab1[-1]);
        push (@saisie,$tab2[-2]);
    }
    elsif($saisie=~/\w+\/*\w+\-*\.*/i){
        my @tab2=split(/\./,$saisie);
        push (@saisie,$tab2[-2]);
        }
    elsif($saisie=~/\w+\-*\w+\.*\w+/){
        my @tab2=split(/\./,$saisie);
        push (@saisie,$tab2[-2]);
    }
    else{
        my @tab1=split(/\//,$saisie);
        my @tab2=split(/\./,$tab1[-1]);
        push (@saisie,$tab2[-2]);
    }
    return $saisie[0];
}

sub move_database{
    my ($saisie)=@_;
    my $rep_courant = cwd();
    my $fichier1 = "/$rep_courant/$saisie.fasta";
    my $fichier2 = "/$rep_courant/$saisie.nhr";
    my $fichier3 = "/$rep_courant/$saisie.nin";
    my $fichier4 = "/$rep_courant/$saisie.nog";
    my $fichier5 = "/$rep_courant/$saisie.nsd";
    my $fichier6 = "/$rep_courant/$saisie.nsi";
    my $fichier7 = "/$rep_courant/$saisie.nsq";
    my $rep = "/$rep_courant/Database/";
    my $h ="Les fichiers base de données sont déjà créés, ils ne peuvent donc pas
    être déplacer dans /Database";
    mv ($fichier2, $rep) or die colored("Move : $h",'bold black');
    mv ($fichier3, $rep) or die colored("Move : $h",'bold black');
```

```
    mv ($fichier4, $rep) or die colored("Move : $h",'bold black');
    mv ($fichier5, $rep) or die colored("Move : $h",'bold black');
    mv ($fichier6, $rep) or die colored("Move : $h",'bold black');
    mv ($fichier7, $rep) or die colored("Move : $h",'bold black');
    mv ($fichier1, $rep) or die colored("Move : $h",'bold black');
}

sub move_fichiers_dossier{
    my (@fichier)= @_;
    my $rep_courant = cwd();
    my $file = pop @fichier;
    my $rep = "/$rep_courant/$file/";
    for ($i=0; $i<=$#fichier; $i++) # pour chaque élement du tableau fichier
    {
        my $fichier1 = "/$rep_courant/$fichier[$i]";
        mv ($fichier1, $rep) or die "mv failed: $!";
    }
}

sub print_resume_blast{
    my ($result,$hit,$hsp)=@_;
    print F
    "Query sequence = ",$result->query_description,
    "\nDatabase sequence = ",$hit->description,
    "\nHit = ",$hsp->query_string,
    "\nlength = ",$hsp->length('total')," bp",
    "\nScore = ",$hsp->bits," bits (",$hsp->score,")",", Expect = ",$hsp->expect,
    "\nE-value = ",$hsp->evalue,
    "\nIdentities = ",$hsp->percent_identity," %",
    (",$hsp->score,"//,$hsp->length('total'),")",", Gaps = ",$hsp->gaps,
    "\nStrand = ",$hsp->strand,"\n\n";
    print T
    "Query sequence = ",$result->query_description,
    "\nDatabase sequence = ",$hit->description,
    "\nHit = ",$hsp->query_string,
    "\nlength = ",$hsp->length('total')," bp",
    "\nScore = ",$hsp->bits," bits (",$hsp->score,")",", Expect = ",$hsp->expect,
    "\nE-value = ",$hsp->evalue,
    "\nIdentities = ",$hsp->percent_identity," %",
    (",$hsp->score,"//,$hsp->length('total'),")",", Gaps = ",$hsp->gaps,
    "\nStrand = ",$hsp->strand,"\n\n";
}

print_amorces{
my ($taillefrag,$amorceF,$i,$tm,$th,$desc,$amorceR,$tm1,$th1,$longueur,$f,$e)=@_;
    print F "Taille fragment: ",$taillefrag," bp","\n"; print T "Taille fragment:
    ",$taillefrag," bp","\n";
    print F "Couple ","$f"," : Amorce Forward : 5'-$amorceF-3'\n"; print T "Couple
    ","$f"," : Amorce Forward : 5'-$amorceF-3'\n";
    print F "\t","   Position : ","$i"," bp","-",$i+20," bp","\n"; print T "\t","
    Position : ","$i"," bp","-",$i+20," bp","\n";
    print F "\t","   Température de fusion: ",$tm,"°C","\n"; print T "\t   Température
    de fusion: ",$tm,"°C","\n";
    print F "\t","   Température d'hybridation: ",$th,"°C","\n\n"; print T "\t
    Température d'hybridation: ",$th,"°C","\n\n";
    print O ">",$desc," Amorce Forward $f","\n";
    print O $amorceF,"\n";
    print F "\t","   Amorce Reverse : 5'-",$amorceR,"-3'\n"; print T "\t   Amorce
    Reverse : 5'-",$amorceR,"-3'\n";
    print F "\t","   Position : ",($longueur-$i)-20," bp","-",$longueur-$i,"
    bp","\n"; print T "\t","   Position : ",($longueur-$i)-20," bp","-
    ",$longueur-$i," bp","\n";
    print F "\t","   Température de fusion: ",$tm1,"°C","\n"; print T "\t   Température
    de fusion: ",$tm1,"°C","\n";
    print F "\t","   Température d'hybridation: ",$th1,"°C","\n\n"; print T "\t
    Température d'hybridation: ",$th1,"°C","\n\n";
    print O ">",$desc," Amorce Reverse $g","\n";
    print O $amorceR,"\n";
}
```

Annexe 4. Script RMarkdown pour l'analyse des données de survie

```
---
title: "Analyse de l'effet préventif de Lcr35 - Bilan"
author: "Cyril Poupet"
date: 'date: TBD'
output:
  pdf_document:
    fig_caption: yes
    keep_tex: yes
    number_sections: yes
    toc: yes
  html_document:
    number_sections: yes
    toc: yes
  word_document: default
---

```{r Chargement des données, echo=FALSE, include=FALSE}
# chargement des packages
library("readxl")
library("survival")
library("survminer")
library("dplyr")

# importation des données pour Candida albicans seul
Temoin.CAA <- read_excel("data.xlsx", sheet = "CAA")

# importation des données pour OP50 seul
Temoin.OP2 <- read_excel("data.xlsx", sheet = "OP2")

Temoin.OP4 <- read_excel("data.xlsx", sheet = "OP4")

Temoin.OP6 <- read_excel("data.xlsx", sheet = "OP6")

Temoin.OP24 <- read_excel("data.xlsx", sheet = "OP24")

# importation des données pour Lcr35 seul
Temoin.Lcr2 <- read_excel("data.xlsx",sheet = "Lcr2")

Temoin.Lcr4 <- read_excel("data.xlsx",sheet = "Lcr4")

Temoin.Lcr6 <- read_excel("data.xlsx",sheet = "Lcr6")

Temoin.Lcr24 <- read_excel("data.xlsx",sheet = "Lcr24")

# importation des données pour OP50 + Candida albicans
D2 <- read_excel("data.xlsx", sheet = "OP_CAA2")

D4 <- read_excel("data.xlsx", sheet = "OP_CAA4")

D6 <- read_excel("data.xlsx", sheet = "OP_CAA6")

D24 <- read_excel("data.xlsx", sheet = "OP_CAA24")

# importation des données pour Lcr35 + Candida albicans
E2 <- read_excel("data.xlsx", sheet = "Lcr_CAA2")

E4 <- read_excel("data.xlsx", sheet = "Lcr_CAA4")

E6 <- read_excel("data.xlsx", sheet = "Lcr_CAA6")

E24 <- read_excel("data.xlsx", sheet = "Lcr_CAA24")
```

Validation des réplicats intra-expérimentaux
```{r Calcul des tables de survie, echo=FALSE, include=FALSE}
fit_Temoin.CAA <- survfit(Surv(Temps, Statut)~rep.inter, data=Temoin.CAA)
summary(fit_Temoin.CAA)$table

pTemoin.CAA<-ggsurvplot(fit_Temoin.CAA,pval = FALSE,pval.size = 2, conf.int =
FALSE,title = "Condition C. albicans ATCC 10231 2h",xlab = "Temps en jours", ylab =
"Probabilité de survie", surv.median.line = 'hv', ggtheme = theme_bw(), legend.title
= "Réplicats", legend.labs = c("r1", "r2", "r3"),palette = c("red", "blue",
"green"),legend=c(0.2,0.2), break.time.by=2, font.x=c("bold"),
font.y=c("bold"),font.tickslab=c("bold"))

fit_Temoin.OP2 <- survfit(Surv(Temps, Statut)~rep.inter, data=Temoin.OP2)
summary(fit_Temoin.OP2)$table

pTemoin.OP2<-ggsurvplot(fit_Temoin.OP2, pval = FALSE, val.size = 2, conf.int =
FALSE, title = "Condition E. coli OP50 2h", xlab = "Temps en jours", ylab =
"Probabilité de survie", surv.median.line = 'hv', ggtheme = theme_bw(), legend.title
= "Réplicats", legend.labs = c("r1", "r2", "r3"), palette = c("red", "blue",
"green"), legend=c(0.2,0.2), break.time.by=2, font.x=c("bold"), font.y=c("bold"),
font.tickslab=c("bold") )

fit_Temoin.OP4 <- survfit(Surv(Temps, Statut)~rep.intra, data=Temoin.OP4)
summary(fit_Temoin.OP4)$table

pTemoin.OP4<-ggsurvplot(fit_Temoin.OP4, pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int =
FALSE, title = "Condition E. coli OP50 4h", xlab = "Temps en jours", ylab =
"Probabilité de survie",surv.median.line = 'hv', ggtheme = theme_bw(), legend.title
= "Réplicats", legend.labs = c("r1", "r2", "r3"), palette = c("red", "blue",
"green"),legend=c(0.2,0.2), break.time.by=2, font.x=c("bold"), font.y=c("bold"),
font.tickslab=c("bold") )

fit_Temoin.OP6 <- survfit(Surv(Temps, Statut)~rep.inter, data=Temoin.OP6)
summary(fit_Temoin.OP6)$table

pTemoin.OP6<-ggsurvplot(fit_Temoin.OP6, pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int =
FALSE, title = "Condition E. coli OP50 6h", xlab = "Temps en jours", ylab =
"Probabilité de survie", surv.median.line = 'hv', ggtheme = theme_bw(), legend.title
= "Réplicats", legend.labs = c("r1", "r2", "r3"), palette = c("red", "blue",
"green"), legend=c(0.2,0.2), break.time.by=2,font.x=c("bold"), font.y=c("bold"),
font.tickslab=c("bold") )

fit_Temoin.OP24 <- survfit(Surv(Temps, Statut)~rep.intra, data=Temoin.OP24)
summary(fit_Temoin.OP24)$table

pTemoin.OP24<-ggsurvplot(fit_Temoin.OP24, pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int =
FALSE, title = "Condition E. coli OP50 24h", xlab = "Temps en jours", ylab =
"Probabilité de survie", surv.median.line = 'hv', ggtheme = theme_bw(), legend.title
= "Réplicats", legend.labs = c("r1", "r2", "r3"), palette = c("red", "blue",
"green"), legend=c(0.2,0.2), break.time.by=2, font.x=c("bold"), font.y=c("bold"),
font.tickslab=c("bold") )

fit_Temoin.Lcr2 <- survfit(Surv(Temps, Statut)~rep.inter, data=Temoin.Lcr2)
summary(fit_Temoin.Lcr2)$table

pTemoin.Lcr2<-ggsurvplot(fit_Temoin.Lcr2, pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int =
FALSE, title = "Condition Lcr35 2h", xlab = "Temps en jours", ylab = "Probabilité de
survie", surv.median.line = 'hv', ggtheme = theme_bw(), legend.title = "Réplicats",
legend.labs = c("r1", "r2", "r3"), palette = c("red", "blue", "green"),
legend=c(0.2,0.2), break.time.by=2,font.x=c("bold"), font.y=c("bold"),
font.tickslab=c("bold"))

fit_Temoin.Lcr4 <- survfit(Surv(Temps, Statut)~rep.inter, data=Temoin.Lcr4)
summary(fit_Temoin.Lcr4)$table

pTemoin.Lcr4<-ggsurvplot(fit_Temoin.Lcr4, pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int =
FALSE, title = "Condition Lcr35 4h", xlab = "Temps en jours", ylab = "Probabilité de
survie", surv.median.line = 'hv', ggtheme = theme_bw(),legend.title = "Réplicats",
legend.labs = c("r1", "r2", "r3"), palette = c("red", "blue", "green"),
legend=c(0.2,0.2), break.time.by=2,font.x=c("bold"), font.y=c("bold"),
font.tickslab=c("bold") )

fit_Temoin.Lcr6 <- survfit(Surv(Temps, Statut)~rep.inter, data=Temoin.Lcr6)
summary(fit_Temoin.Lcr6)$table

pTemoin.Lcr6<-ggsurvplot(fit_Temoin.Lcr6, pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int =
FALSE, title = "Condition Lcr35 6h", xlab = "Temps en jours", ylab = "Probabilité de
survie", surv.median.line = 'hv', ggtheme = theme_bw(), legend.title = "Réplicats",
legend.labs = c("r1", "r2", "r3"), palette = c("red", "blue", "green"),
legend=c(0.2,0.2), break.time.by=2, font.x=c("bold"), font.y=c("bold"),
font.tickslab=c("bold") )

fit_Temoin.Lcr24 <- survfit(Surv(Temps, Statut)~rep.inter, data=Temoin.Lcr24)
```
```

ANNEXE 4

```
summary(fit_Temoin.Lcr24)$table

pTemoin.Lcr24<-ggsurvplot(fit_Temoin.Lcr24, pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int =
FALSE, title = "Condition Lcr35 24h", xlab = "Temps en jours", ylab = "Probabilité
de survie", surv.median.line = 'hv', ggtheme = theme_bw(), legend.title =
"Réplicats", legend.labs = c("r1", "r2", "r3"), palette = c("red", "blue", "green"),
legend=c(0.2,0.2), break.time.by=2, font.x=c("bold"), font.y=c("bold"),
font.tickslab=c("bold") )

fit_D2 <- survfit(Surv(Temps, Statut)~rep.inter, data=D2)
summary(fit_D2)$table

pD2<-ggsurvplot(fit_D2, pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int = FALSE, title =
"Condition OP50 2h + C. albicans ATCC 10231 2h", xlab = "Temps en jours", ylab =
"Probabilité de survie", surv.median.line = 'hv', ggtheme = theme_bw(), legend.title
= "Réplicats", legend.labs = c("r1", "r2", "r3"), palette = c("red", "blue",
"green"), legend=c(0.2,0.2), break.time.by=2, font.x=c("bold"), font.y=c("bold"),
font.tickslab=c("bold") )

fit_D4 <- survfit(Surv(Temps, Statut)~rep.inter, data=D4)
summary(fit_D4)$table

pD4<-ggsurvplot(fit_D4, pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int = FALSE, title =
"Condition OP50 4h + C. albicans ATCC 10231 2h", xlab = "Temps en jours", ylab =
"Probabilité de survie", surv.median.line = 'hv', ggtheme = theme_bw(), legend.title
= "Réplicats", legend.labs = c("r1", "r2", "r3"), palette = c("red", "blue",
"green"), legend=c(0.2,0.2), break.time.by=2, font.x=c("bold"), font.y=c("bold"),
font.tickslab=c("bold") )

fit_D6 <- survfit(Surv(Temps, Statut)~rep.inter, data=D6)
summary(fit_D6)$table

pD6<-ggsurvplot(fit_D6, pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int = FALSE, title =
"Condition OP50 6h + C. albicans ATCC 10231 2h", xlab = "Temps en jours", ylab =
"Probabilité de survie", surv.median.line = 'hv', ggtheme = theme_bw(), legend.title
= "Réplicats", legend.labs = c("r1", "r2", "r3"), palette = c("red", "blue",
"green"), legend=c(0.2,0.2), break.time.by=2, font.x=c("bold"), font.y=c("bold"),
font.tickslab=c("bold") )

fit_D24 <- survfit(Surv(Temps, Statut)~rep.inter, data=D24)
summary(fit_D24)$table

pD24<-ggsurvplot(fit_D24, pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int = FALSE, title =
"Condition OP50 24h + C. albicans ATCC 10231 2h", xlab = "Temps en jours", ylab =
"Probabilité de survie", surv.median.line = 'hv', ggtheme = theme_bw(), legend.title
= "Réplicats", legend.labs = c("r1", "r2", "r3"), palette = c("red", "blue",
"green"), legend=c(0.2,0.2), break.time.by=2, font.x=c("bold"), font.y=c("bold"),
font.tickslab=c("bold") )

fit_E2 <- survfit(Surv(Temps, Statut)~rep.inter, data=E2)
summary(fit_E2)$table

pE2<-ggsurvplot(fit_E2, pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int = FALSE, title =
"Condition Lcr35 2h + C. albicans ATCC10231 2h", xlab = "Temps en jours", ylab =
"Probabilité de survie", surv.median.line = 'hv', ggtheme = theme_bw(), legend.title
= "Réplicats", legend.labs = c("r1", "r2", "r3"), palette = c("red", "blue",
"green"), legend=c(0.2,0.2), break.time.by=2, font.x=c("bold"), font.y=c("bold"),
font.tickslab=c("bold") )

fit_E4 <- survfit(Surv(Temps, Statut)~rep.inter, data=E4)
summary(fit_E4)$table

pE4<-ggsurvplot(fit_E4, pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int = FALSE, title =
"Condition Lcr35 4h + C. albicans ATCC10231 2h", xlab = "Temps en jours", ylab =
"Probabilité de survie", surv.median.line = 'hv', ggtheme = theme_bw(), legend.title
= "Réplicats", legend.labs = c("r1", "r2", "r3"), palette = c("red", "blue",
"green"), legend=c(0.2,0.2), break.time.by=2, font.x=c("bold"), font.y=c("bold"),
font.tickslab=c("bold") )

fit_E6 <- survfit(Surv(Temps, Statut)~rep.inter, data=E6)
summary(fit_E6)$table

pE6<-ggsurvplot(fit_E6, pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int = FALSE, title =
"Condition Lcr35 6h + C. albicans ATCC10231 2h", xlab = "Temps en jours", ylab =
"Probabilité de survie", surv.median.line = 'hv', ggtheme = theme_bw(), legend.title
= "Réplicats", legend.labs = c("r1", "r2", "r3"), palette = c("red", "blue",
"green"), legend=c(0.2,0.2), break.time.by=2, font.x=c("bold"), font.y=c("bold"),
font.tickslab=c("bold") )

fit_E24 <- survfit(Surv(Temps, Statut)~rep.inter, data=E24)
summary(fit_E24)$table

pE24<-ggsurvplot(fit_E24, pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int = FALSE, title =
"Condition Lcr35 24h + C. albicans ATCC10231 2h", xlab = "Temps en jours", ylab =
"Probabilité de survie", surv.median.line = 'hv', ggtheme = theme_bw(), legend.title
= "Réplicats", legend.labs = c("r1", "r2", "r3"), palette = c("red", "blue",
"green"), legend=c(0.2,0.2), break.time.by=2, font.x=c("bold"), font.y=c("bold"),
font.tickslab=c("bold") )
```

```
print(pE4)
summary(fit_E4)$table
survdiff(formula=Surv(Temps, Statut)~rep.inter,data=E4)

print(pE6)
summary(fit_E6)$table
survdiff(formula=Surv(Temps, Statut)~rep.inter,data=E6)

print(pE24)
summary(fit_E24)$table
survdiff(formula=Surv(Temps, Statut)~rep.inter,data=E24)
```

```
# Comparaison des conditions t = 2 heures
```{r, echo=FALSE, include=FALSE}
Bilan2 <- dplyr::full_join(Temoin.CAA,D2)
Bilan2 <- dplyr::full_join(Bilan2,Temoin.OP2)
Bilan2 <- dplyr::full_join(Bilan2,Temoin.Lcr2)
Bilan2 <- dplyr::full_join(Bilan2,E2)

fit_Bilan2 <- survfit(Surv(Temps, Statut)~Souche, data=Bilan2)
pBilan2<-ggsurvplot(fit_Bilan2, pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int = TRUE, title
= "Preventive effect of Lcr35 against Candida albicans (ATCC 10231, 2h)", xlab =
"Time (days)", ylab = "Survival probability", surv.median.line = 'hv', ggtheme =
theme_bw(), legend.title = "Conditions", legend.labs = c("A","B","C","D","E"),
palette = c("red", "black","blue","purple","green"), linetype = c("solid",
"solid","solid","solid","solid"), legend=c(0.90,0.75), break.time.by=1,
xlim=c(0,17), font.x=c("bold"), font.y=c("bold"), font.tickslab=c("bold") )

Temoin.CAA_D2<-filter(Bilan2,Souche=="A"|Souche=="D1")
Temoin.CAA_E2<-filter(Bilan2,Souche=="A"|Souche=="E1")
Temoin.CAA_C2<-filter(Bilan2,Souche=="A"|Souche=="C1")
Temoin.CAA_B2<-filter(Bilan2,Souche=="A"|Souche=="B1")

D2E2<-filter(Bilan2,Souche=="D1"|Souche=="E1")
D2C2<-filter(Bilan2,Souche=="D1"|Souche=="C1")
D2B2<-filter(Bilan2,Souche=="D1"|Souche=="B1")
E2C2<-filter(Bilan2,Souche=="E1"|Souche=="C1")
E2B2<-filter(Bilan2,Souche=="E1"|Souche=="B1")
B2C2<-filter(Bilan2,Souche=="B1"|Souche=="C1")
```

Courbes de survie récapitulatives (t = 2 heures)
```{r Courbes de survie bilans t2, echo=FALSE}
print(pBilan2)
```

Analyses statistiques : test du log rank (t = 2 heures)
```{r Analyses statistiques t2, echo=FALSE}
summary(fit_Bilan2)$table
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=Temoin.CAA_D2)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=Temoin.CAA_E2)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=Temoin.CAA_C2)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=Temoin.CAA_B2)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=D2E2)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=D2C2)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=D2B2)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=E2C2)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=E2B2)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=B2C2)
```

Comparaison des conditions t = 4 heures
```{r, echo=FALSE, include=FALSE}
Bilan4 <- dplyr:::full_join(Temoin.CAA,D4)
Bilan4 <- dplyr::full_join(Bilan4,Temoin.OP4)
Bilan4 <- dplyr::full_join(Bilan4,Temoin.Lcr4)
Bilan4 <- dplyr::full_join(Bilan4,E4)

fit_Bilan4 <- survfit(Surv(Temps, Statut)~Souche, data=Bilan4)
pBilan4<-ggsurvplot(fit_Bilan4, pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int = FALSE, title
= "Preventive effect of Lcr35 against Candida albicans (ATCC 10231, 4h)", xlab =
"Time (days)", ylab = "Survival probability", surv.median.line = 'hv', ggtheme =
theme_bw(), legend.title = "Conditions", legend.labs = c("A","B","C","D","E"),
palette = c("red", "black","blue","purple","green"), linetype = c("solid",
"solid","solid","solid","solid"), legend=c(0.90,0.75), break.time.by=1,
xlim=c(0,17), font.x=c("bold"), font.y=c("bold"), font.tickslab=c("bold") )

Temoin.CAA_D4<-filter(Bilan4,Souche=="A"|Souche=="D2")
Temoin.CAA_E4<-filter(Bilan4,Souche=="A"|Souche=="E2")
Temoin.CAA_C4<-filter(Bilan4,Souche=="A"|Souche=="C2")
Temoin.CAA_B4<-filter(Bilan4,Souche=="A"|Souche=="B2")

D4E4<-filter(Bilan4,Souche=="D2"|Souche=="E2")
D4C4<-filter(Bilan4,Souche=="D2"|Souche=="C2")
D4B4<-filter(Bilan4,Souche=="D2"|Souche=="B2")
E4C4<-filter(Bilan4,Souche=="E2"|Souche=="C2")
E4B4<-filter(Bilan4,Souche=="E2"|Souche=="B2")
B4C4<-filter(Bilan4,Souche=="B2"|Souche=="C2")
```

Courbes de survie récapitulatives (t = 4 heures)
```{r Courbes de survie bilans t4, echo=FALSE}
print(pBilan4)
```

Analyses statistiques : test du log rank (t = 4 heures)
```{r Analyses statistiques t4, echo=FALSE}
summary(fit_Bilan4)$table
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=Temoin.CAA_D4)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=Temoin.CAA_E4)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=Temoin.CAA_C4)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=Temoin.CAA_B4)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=D4E4)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=D4C4)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=D4B4)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=E4C4)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=E4B4)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=B4C4)
```

Comparaison des conditions t = 6 heures
```{r, echo=FALSE, include=FALSE}
Bilan6 <- dplyr::full_join(Temoin.CAA,D6)
Bilan6 <- dplyr::full_join(Bilan6,Temoin.OP6)
Bilan6 <- dplyr::full_join(Bilan6,Temoin.Lcr6)
Bilan6 <- dplyr::full_join(Bilan6,E6)

fit_Bilan6 <- survfit(Surv(Temps, Statut)~Souche, data=Bilan6)
pBilan6<-ggsurvplot(fit_Bilan6, pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int = FALSE, title
= "Preventive effect of Lcr35 against Candida albicans (ATCC 10231, 6h)", xlab =
"Time (days)", ylab = "Survival probability", surv.median.line = 'hv', ggtheme =
theme_bw(), legend.title = "Conditions", legend.labs = c("A","B","C","D","E"),
palette = c("red", "black","blue","purple","green"), linetype = c("solid",
"solid","solid","solid","solid"), legend=c(0.90,0.75), break.time.by=1,
xlim=c(0,17),font.x=c("bold"), font.y=c("bold"), font.tickslab=c("bold") )

Temoin.CAA_D6<-filter(Bilan6,Souche=="A"|Souche=="D3")
Temoin.CAA_E6<-filter(Bilan6,Souche=="A"|Souche=="E3")
Temoin.CAA_C6<-filter(Bilan6,Souche=="A"|Souche=="C3")
Temoin.CAA_B6<-filter(Bilan6,Souche=="A"|Souche=="B3")

D6E6<-filter(Bilan6,Souche=="D3"|Souche=="E3")
D6C6<-filter(Bilan6,Souche=="D3"|Souche=="C3")
D6B6<-filter(Bilan6,Souche=="D3"|Souche=="B3")
E6C6<-filter(Bilan6,Souche=="E3"|Souche=="C3")
E6B6<-filter(Bilan6,Souche=="E3"|Souche=="B3")
B6C6<-filter(Bilan6,Souche=="B3"|Souche=="C3")
```

Courbes de survie récapitulatives (t = 6 heures)
```{r Courbes de survie bilans t6, echo=FALSE}
print(pBilan6)
```
```

````
## Analyses statistiques : test du log rank (t = 6 heures)
```{r Analyses statistiques t6, echo=FALSE}
summary(fit_Bilan6)$table
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=Temoin.CAA_D6)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=Temoin.CAA_E6)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=Temoin.CAA_C6)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=Temoin.CAA_B6)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=D6E6)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=D6C6)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=D6B6)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=E6C6)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=E6B6)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=B6C6)
```

# Comparaison des conditions t = 24 heures
```{r, echo=FALSE, include=FALSE}
Bilan24 <- dplyr::full_join(Temoin.CAA,D24)
Bilan24 <- dplyr::full_join(Bilan24,Temoin.OP24)
Bilan24 <- dplyr::full_join(Bilan24,Temoin.Lcr24)
Bilan24 <- dplyr::full_join(Bilan24,E24)

fit_Bilan24 <- survfit(Surv(Temps, Statut)~Souche, data=Bilan24)
pBilan24<-ggsurvplot(fit_Bilan24, pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int = FALSE,
title = "Preventive effect of Lcr35 against Candida albicans (ATCC 10231, 24h)",
xlab = "Time (days)", ylab = "Survival probability", surv.median.line = 'hv',
ggtheme = theme_bw(), legend.title = "Conditions", legend.labs =
c("A","B","C","D","E"), palette = c("red", "black","blue","purple","green"),
linetype = c("solid", "solid","solid","solid","solid"), legend=c(0.90,0.75),
break.time.by=1, xlim=c(0,17), font.x=c("bold"), font.y=c("bold"),
font.tickslab=c("bold") )

Temoin.CAA_D24<-filter(Bilan24,Souche=="A"|Souche=="D4")
Temoin.CAA_E24<-filter(Bilan24,Souche=="A"|Souche=="E4")
Temoin.CAA_C24<-filter(Bilan24,Souche=="A"|Souche=="C4")
Temoin.CAA_B24<-filter(Bilan24,Souche=="A"|Souche=="B4")

D24E24<-filter(Bilan24,Souche=="D4"|Souche=="E4")
D24C24<-filter(Bilan24,Souche=="D4"|Souche=="C4")
D24B24<-filter(Bilan24,Souche=="D4"|Souche=="B4")
E24C24<-filter(Bilan24,Souche=="E4"|Souche=="C4")
E24B24<-filter(Bilan24,Souche=="E4"|Souche=="B4")
B24C24<-filter(Bilan24,Souche=="B4"|Souche=="C4")
```

## Courbes de survie récapitulatives (t = 24 heures)
```{r Courbes de survie bilans t24, echo=FALSE}
print(pBilan24)
```

## Analyses statistiques : test du log rank (t = 24 heures)
```{r Analyses statistiques t24, echo=FALSE}
summary(fit_Bilan24)$table
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=Temoin.CAA_D24)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=Temoin.CAA_E24)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=Temoin.CAA_C24)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=Temoin.CAA_B24)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=D24E24)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=D24C24)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=D24B24)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=E24C24)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=E24B24)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=B24C24)
```

# Tests statistiques "inter temps"
## Comparaison Témoin E. coli OP50
```{r, echo=FALSE, include=FALSE}
BilanTOP <- dplyr::full_join(Temoin.OP2,Temoin.OP4)
BilanTOP <- dplyr::full_join(BilanTOP,Temoin.OP6)
BilanTOP <- dplyr::full_join(BilanTOP,Temoin.OP24)

fit_BilanTOP <- survfit(Surv(Temps, Statut)~Souche, data=BilanTOP)

fit_BilanOC <- survfit(Surv(Temps, Statut)~Souche, data=BilanOC)
pBilanOC<-ggsurvplot(fit_BilanOC,pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int = FALSE,title
= "Comparaison des courbes OP50 + Candida", xlab = "Time (days)", ylab = "Survival
probability", surv.median.line = 'hv', ggtheme = theme_bw(), legend.title =
"Conditions", legend.labs = c("2h","4h","6h","24h"), palette = c("red",
"black","blue","purple"), linetype = c("solid", "solid","solid","solid"),
legend=c(0.90,0.75), break.time.by=1, xlim=c(0,17), font.x=c("bold"),
font.y=c("bold"), font.tickslab=c("bold") )

D2.D4<-filter(BilanOC,Souche=="D1"|Souche=="D2")
D2.D6<-filter(BilanOC,Souche=="D1"|Souche=="D3")
D2.D24<-filter(BilanOC,Souche=="D1"|Souche=="D4")
D4.D6<-filter(BilanOC,Souche=="D2"|Souche=="D3")
D4.D24<-filter(BilanOC,Souche=="D2"|Souche=="D4")
D6.D24<-filter(BilanOC,Souche=="D3"|Souche=="D4")
```

```{r Courbes de survie bilans OC, echo=FALSE}
print(pBilanOC)
```

```{r Analyses statistiques OC, echo=FALSE}
summary(fit_BilanOC)$table
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=D2.D4)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=D2.D6)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=D2.D24)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=D4.D6)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=D4.D24)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=D6.D24)
```
## Comparaison Lcr35 + C. albicans

```{r, echo=FALSE, include=FALSE}
BilanOL <- dplyr::full_join(E2,E4)
BilanOL <- dplyr::full_join(BilanOL,E6)
BilanOL <- dplyr::full_join(BilanOL,E24)

fit_BilanOL <- survfit(Surv(Temps, Statut)~Souche, data=BilanOL)
pBilanOL<-ggsurvplot(fit_BilanOL, pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int = FALSE,
title = "Comparaison des courbes Lcr35 + Candida", xlab = "Time (days)", ylab =
"Survival probability", surv.median.line = 'hv', ggtheme = theme_bw(), legend.title
= "Conditions", legend.labs = c("2h","4h","6h","24h"), palette = c("red",
"black","blue","purple"), linetype = c("solid", "solid","solid","solid"),
legend=c(0.90,0.75), break.time.by=1, xlim=c(0,17), font.x=c("bold"),
font.y=c("bold"), font.tickslab=c("bold") )

E2.E4<-filter(BilanOL,Souche=="E1"|Souche=="E2")
E2.E6<-filter(BilanOL,Souche=="E1"|Souche=="E3")
E2.E24<-filter(BilanOL,Souche=="E1"|Souche=="E4")
E4.E6<-filter(BilanOL,Souche=="E2"|Souche=="E3")
E4.E24<-filter(BilanOL,Souche=="E2"|Souche=="E4")
E6.E24<-filter(BilanOL,Souche=="E3"|Souche=="E4")
```

```{r Courbes de survie bilans OL, echo=FALSE}
print(pBilanOL)
```

```{r Analyses statistiques OL, echo=FALSE}
summary(fit_BilanOL)$table
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=E2.E4)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=E2.E6)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=E2.E24)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=E4.E6)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=E4.E24)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=E6.E24)
```

pBilanTOP<-ggsurvplot(fit_BilanTOP, pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int = FALSE,
title = "Comparaison des courbes témoins OP50", xlab = "Time (days)", ylab =
"Survival probability", surv.median.line = 'hv', ggtheme = theme_bw(), legend.title
= "Conditions", legend.labs = c("2h","4h","6h","24h"), palette = c("red",
"black","blue","purple"), linetype = c("solid", "solid","solid","solid"),
legend=c(0.90,0.75), break.time.by=1, xlim=c(0,17), font.x=c("bold"),
font.y=c("bold"), font.tickslab=c("bold") )

B2.B4<-filter(BilanTOP,Souche=="B1"|Souche=="B2")
B2.B6<-filter(BilanTOP,Souche=="B1"|Souche=="B3")
B2.B24<-filter(BilanTOP,Souche=="B1"|Souche=="B4")
B4.B6<-filter(BilanTOP,Souche=="B2"|Souche=="B3")
B4.B24<-filter(BilanTOP,Souche=="B2"|Souche=="B4")
B6.B24<-filter(BilanTOP,Souche=="B3"|Souche=="B4")
```

```{r Courbes de survie bilans TOP, echo=FALSE}
print(pBilanTOP)
```

```{r Analyses statistiques TOP, echo=FALSE}
summary(fit_BilanTOP)$table
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=B2.B4)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=B2.B6)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=B2.B24)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=B4.B6)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=B4.B24)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=B6.B24)
```

## Comparaison Témoin Lcr35
```{r, echo=FALSE, include=FALSE}
BilanTL <- dplyr::full_join(Temoin.Lcr2,Temoin.Lcr4)
BilanTL <- dplyr::full_join(BilanTL,Temoin.Lcr6)
BilanTL <- dplyr::full_join(BilanTL,Temoin.Lcr24)

fit_BilanTL <- survfit(Surv(Temps, Statut)~Souche, data=BilanTL)
pBilanTL<-ggsurvplot(fit_BilanTL, pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int = FALSE,
title = "Comparaison des courbes témoins Lcr35", xlab = "Time (days)", ylab =
"Survival probability", surv.median.line = 'hv', ggtheme = theme_bw(), legend.title
= "Conditions", legend.labs = c("2h","4h","6h","24h"), palette = c("red",
"black","blue","purple"), linetype = c("solid", "solid","solid","solid"),
legend=c(0.90,0.75),break.time.by=1, xlim=c(0,17), font.x=c("bold"),
font.y=c("bold"), font.tickslab=c("bold") )

C2.C4<-filter(BilanTL,Souche=="C1"|Souche=="C2")
C2.C6<-filter(BilanTL,Souche=="C1"|Souche=="C3")
C2.C24<-filter(BilanTL,Souche=="C1"|Souche=="C4")
C4.C6<-filter(BilanTL,Souche=="C2"|Souche=="C3")
C4.C24<-filter(BilanTL,Souche=="C2"|Souche=="C4")
C6.C24<-filter(BilanTL,Souche=="C3"|Souche=="C4")
```

```{r Courbes de survie bilans TL, echo=FALSE}
print(pBilanTL)
```

```{r Analyses statistiques TL, echo=FALSE}
summary(fit_BilanTL)$table
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=C2.C4)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=C2.C6)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=C2.C24)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=C4.C6)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=C4.C24)
survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=C6.C24)
```

## Comparaison E. coli OP50 + C. albicans

```{r, echo=FALSE, include=FALSE}
BilanOC <- dplyr::full_join(D2,D4)
BilanOC <- dplyr::full_join(BilanOC,D6)
BilanOC <- dplyr::full_join(BilanOC,D24)
````