



**HAL**  
open science

# Développement d'une méthodologie preuve de concept pour la recherche et la détermination des fonctionnalités des flores microbiennes et des aliments fermentés

Guillaume Cardin

► **To cite this version:**

Guillaume Cardin. Développement d'une méthodologie preuve de concept pour la recherche et la détermination des fonctionnalités des flores microbiennes et des aliments fermentés. Santé. Université Clermont Auvergne, 2021. Français. NNT : 2021UCFAC070 . tel-03662498

**HAL Id: tel-03662498**

**<https://theses.hal.science/tel-03662498>**

Submitted on 9 May 2022

**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.

# Université Clermont Auvergne

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

VetAgro Sup

Campus Agronomique de Clermont-Ferrand

*Unité Mixte de Recherche sur le Fromage 0545*

**Développement d'une méthodologie preuve de concept pour la  
recherche et la détermination des fonctionnalités des flores  
microbiennes et des aliments fermentés**

**Guillaume Cardin**

Doctorat Biologie – Santé  
Spécialité Biotechnologie

Directeur de thèse : Professeur Laurent Rios, VetAgro Sup  
Co-Directrice de thèse : Professeure Stéphanie Bornes, UCA

Soutenue publiquement le 10 septembre 2021

Membres du jury

<b>Pr. Pierre Chalard</b> , UMR 6296, ICCF, Clermont Auvergne INP, Aubière	Président
<b>Pr. Delphine Joseph</b> , UMR CNRS 8076 BioCIS, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry	Rapporteuse
<b>Pr. Sophie Landaud</b> , UMR 0782 GMPA, INRAE – AgroParisTech, Thiverval-Grignon	Rapporteuse
<b>Dr. Romain Jouve</b> , Dômes Pharma, Pont-du-Château	Examineur
<b>Pr. Stéphanie Bornes</b> , UMRF 0545, Université Clermont Auvergne, Aurillac	Co-Directrice de thèse
<b>Pr. Laurent Rios</b> , UMRF 0545, VetAgro Sup, Clermont-Ferrand	Directeur de thèse
<b>Dr. Christophe Poix</b> , UMR Territoires 1273, VetAgro Sup, Clermont Ferrand	Membre invité
<b>Dr. Julien Priam</b> , Dômes Pharma, Pont-du-Château	Membre invité



# Université Clermont Auvergne

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

VetAgro Sup

Campus Agronomique de Clermont-Ferrand

*Unité Mixte de Recherche sur le Fromage 0545*

**Développement d'une méthodologie preuve de concept pour la  
recherche et la détermination des fonctionnalités des flores  
microbiennes et des aliments fermentés**

**Guillaume Cardin**

Doctorat Biologie – Santé  
Spécialité Biotechnologie

Directeur de thèse : Professeur Laurent Rios, VetAgro Sup  
Co-Directrice de thèse : Professeure Stéphanie Bornes, UCA

Soutenue publiquement le 10 septembre 2021

Membres du jury

<b>Pr. Pierre Chalard</b> , UMR 6296, ICCF, Clermont Auvergne INP, Aubière	Président
<b>Pr. Delphine Joseph</b> , UMR CNRS 8076 BioCIS, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry	Rapporteuse
<b>Pr. Sophie Landaud</b> , UMR 0782 GMPA, INRAE – AgroParisTech, Thiverval-Grignon	Rapporteuse
<b>Dr. Romain Jouve</b> , Dômes Pharma, Pont-du-Château	Examineur
<b>Pr. Stéphanie Bornes</b> , UMRF 0545, Université Clermont Auvergne, Aurillac	Co-Directrice de thèse
<b>Pr. Laurent Rios</b> , UMRF 0545, VetAgro Sup, Clermont-Ferrand	Directeur de thèse
<b>Dr. Christophe Poix</b> , UMR Territoires 1273, VetAgro Sup, Clermont Ferrand	Membre invité
<b>Dr. Julien Priam</b> , Dômes Pharma, Pont-du-Château	Membre invité



# Résumé

Depuis toujours, l'Homme a eu recours à la nature pour subvenir à ses besoins. Aujourd'hui encore, le secteur de la santé (animale et humaine) s'intéresse aux ressources naturelles pour découvrir des principes actifs originaux permettant de développer de nouveaux traitements. Ce secteur est notamment à la recherche de nouvelles molécules pouvant lutter contre les processus biologiques impliqués dans les affections liées au vieillissement, qui induisent une problématique de santé publique. Bien que la bioressource végétale ait été la plus étudiée pour ses propriétés pharmacologiques, d'autres ressources naturelles restent à explorer, telle que la bioressource microbienne. Les microorganismes non pathogènes, notamment ceux régulièrement consommés au travers des aliments et boissons fermentés, représentent une source intéressante de métabolites potentiellement actifs sur ces processus. Parmi ces aliments, le fromage au lait cru présente un fort potentiel grâce à la richesse de sa biodiversité microbienne.

Une stratégie innovante a été développée au cours de cette thèse pour rechercher des métabolites bioactifs dans un caillé lactique caprin. Cette stratégie a permis l'obtention de plusieurs extraits de fromage, à l'aide d'une méthode d'extraction dont l'efficacité a été validée. Le criblage de l'effet des extraits sur le vieillissement a ensuite été réalisé à l'aide de modèles biologiques *in vitro* et *in vivo*. Leurs impacts sur la longévité du modèle *Caenorhabditis elegans* et sur sa survie sur un milieu oxydant ont notamment été évalués. Plusieurs des extraits (fromage lyophilisé, extrait apolaire, 3 extraits aqueux différents) ont par ailleurs montré des effets bénéfiques au cours de ces expériences. Les voies biologiques impliquées dans l'action des extraits ont également pu être identifiées (voie DAF-2/ILR et voie p38 MAPK). En parallèle, deux extraits (extrait apolaire et un des extraits aqueux) ont induit une diminution de la production de radicaux libres dans un modèle de leucocytes humains. Enfin, l'étude de la composition des extraits ayant présenté des résultats bénéfiques a débuté, avec pour objectif de cibler, parmi toutes les molécules les composant, celles pouvant être porteuses de l'activité biologique. L'ensemble des résultats obtenus est prometteur, et encourage à poursuivre les études de la composition des extraits issus du fromage ainsi que de leurs activités biologiques, notamment sur des modèles plus spécifiques du vieillissement.

*Mots-clés* : Fromage au lait cru, microorganismes, métabolite naturel bioactif, *Caenorhabditis elegans*, longévité, stress oxydatif



# Abstract

Natural products have always been a successful source of new drugs. Nowadays, the health sector (animal and human) is still looking for new compounds from natural resources, especially those which can exhibit a beneficial effect on the biological processes involved in the age-related affections (which have become a public health issue). The plants have already been investigating for this application. However, other natural resources, such as the microbial diversity, remain unexplored for the bioactivity of their compounds. The non-pathogenic microorganisms, especially those that can be found in fermented foods and drinks, could be considered as an interesting and innovative source of new metabolites that could exhibit beneficial effects. Among those fermented foods, the raw-milk cheese appears to have a great potential, as a source of new compounds, due to its rich microbial diversity.

An innovative strategy was developed in this thesis with the aim of discovering new bioactive metabolites in a raw goat milk cheese. Several cheese extracts were obtained *via* an extraction method, which efficacy has been validated. The effect of the extracts on aging has been determined on *in vitro* and on *in vivo* models. Their impacts on the longevity of the nematode *Caenorhabditis elegans*, and on its survival on an oxidative medium have been evaluated. Some extracts (freeze-dried cheese, apolar extract and three aqueous extracts) have demonstrated beneficial effects during these experiments. Moreover, two signalling pathways (DAF-2/ILR pathway and p38 MAPK pathway) were identified to be involved in the mechanisms of action of the extracts. In parallel, two extracts (apolar extract and an aqueous extract) demonstrated a capacity to reduce the ROS production in human leukocytes. Finally, the study of the chemical composition of the bioactive extracts has begun, with the aim of determining the compounds that could be responsible of the biological activity and deserve to be isolated and studied. All the results obtained during this thesis are promising. The study of the chemical composition of the extracts will be pursued, as well as the study of their biological activity, especially on other *in vitro* and *in vivo* models more specific to aging.

Keywords: Raw-milk cheese, microorganisms, natural bioactive metabolite, *Caenorhabditis elegans*, longevity, oxidative stress





## Remerciements

*Je tiens à adresser ma reconnaissance aux membres de mon jury de thèse qui me font l'honneur d'accepter de juger ce travail de thèse.*

*Mes premiers remerciements s'adressent naturellement à mon directeur de thèse Laurent Rios, qui m'a encadré tout au long de ces trois années. Merci de m'avoir fait confiance pour mener ce travail de thèse. Je te remercie énormément pour tous les conseils que tu m'as donnés, qui m'ont permis d'avancer et de progresser dans ce travail de recherche, même dans les moments difficiles. Merci pour tout ce que tu m'as appris tout au long de ces trois années. Merci pour tout ce que tu as fait pour moi.*

*Je remercie également ma co-directrice de thèse Stéphanie Bornes, pour m'avoir encadré lors de mes séjours à Aurillac et pour ses précieux conseils dans le domaine de la biologie qui m'était jusqu'alors inconnu. Merci de m'avoir fait découvrir le nématode et d'avoir répondu à toutes mes interrogations.*

*Je tiens à remercier VetAgro Sup, particulièrement la Direction Générale et la Direction Scientifique, pour la confiance accordée et pour avoir jugé favorablement cette thématique de thèse. Je remercie Christophe Chassard, Directeur de l'UMRF, pour m'avoir accueilli au sein de son unité et pour ses conseils. Ces travaux de recherche n'auraient pas été possibles sans le soutien de Dômes Pharma, et notamment Anne Chauder, Etienne Saunier et Julien Priam, pour leur confiance envers moi et les travaux de cette thèse. Je remercie également l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand pour m'avoir accueilli dans ses locaux.*

*Je remercie vivement Pierre Chalard et Isabelle Ripoché pour leurs conseils en chimie tout au long de la thèse et pour leur bonne humeur. Merci pour les bons moments passés au*

*laboratoire. Pierre, je reste sur mes gardes, je sais que tu n'as pas oublié ta vengeance pour la bataille d'eau !*

*Je remercie particulièrement Cyril Poupet, ancien doctorant avec qui j'ai compté des vers et qui est désormais docteur. Merci pour tous les conseils que tu m'as donnés au cours de la thèse et pour m'avoir enseigné ce dont j'avais besoin pour réaliser mes expériences. Merci de m'avoir appris à manipuler le ver, malgré quelques débuts ratés (ce n'est pas facile !). Merci d'avoir accepté que je partage ton bureau (littéralement), avec ta petite décoration personnelle, et pour tous les bons moments au laboratoire. Merci pour ton amitié ! Je remercie également Muriel Bonnet et Philippe Veisseire pour leurs conseils et leur aide au cours des expériences. Merci à tous les trois pour votre bonne humeur au laboratoire, qui m'a permis de passer des bons moments, même lors des longs comptages de vers. Je remercie également tous les membres de l'UMRF pour l'aide qu'ils ont pu m'apporter durant ces trois années, ainsi que l'ensemble du personnel présent sur le campus d'Aurillac pour leur aide et leur sympathie. Je remercie Anaïs Volzy, stagiaire au sein de l'UMRF, pour le travail accompli et le sérieux dont elle a fait preuve au cours de son stage.*

*Mes remerciements s'adressent également au Docteur Christophe Poix pour son travail et son aide lors de l'analyse comparative des profils d'extraits. Merci pour ce que tu as fait et pour avoir répondu à mes interrogations.*

*Je tiens à remercier les collègues de l'équipe CESMA pour leur aide et avec qui j'ai passé de bons moments, que ce soit au travail ou en dehors. Je remercie notamment : Vassili et ses gentils compliments qui vont me manquer (néanmoins, le chocolat noir reste le meilleur !); Laurie, notre « saboteuse » officielle, même si tu préfères les gâteaux de Vassili car eux, ils sont bons ; Maël, pour tous les conseils que tu m'as donnés au cours de la thèse, et pour ta bonne humeur au laboratoire ; Antoine et Jeanne pour vos blagues d'un humour inégal, Nour et ta*

*passion des dragibus ; Lucille, pour tous les conseils et l'aide que tu m'as apportée, et pour tous les sourires dont nous avons pu profiter ; Claire et Robin pour votre bonne humeur au laboratoire; Isabelle T. grâce à qui je n'étais pas le seul normand. Je remercie également le personnel de l'ICCF et de Sigma Clermont pour l'aide qu'ils ont pu m'apporter au cours de mes travaux de thèse.*

*Ma reconnaissance s'adresse à Mme la Professeure Sophie Landaud, au Docteur Etienne Saunier et au Docteur François Senejoux qui, au travers de leurs conseils au cours des comités de thèse, m'ont permis d'orienter mes recherches plus efficacement.*

*Mes prochains remerciements s'adressent tout naturellement à toi, Solène, mon épouse. Merci pour m'avoir soutenu (et supporté !) pendant ces trois années. Merci pour tes conseils et tes attentions, en particulier dans les moments difficiles qui m'ont donné la force et la conviction de continuer malgré les difficultés. Je remercie également mes parents Catherine et Olivier ainsi que ma sœur Ameline, pour leur soutien tout au long de ces trois années qui m'a grandement aidé.*

*Un grand merci à Thomas et Céline pour votre amitié et votre soutien au cours de ces trois années. Merci pour les bons moments passés avec vous, et peut-être qu'on pourra aller en Espagne cette fois-ci ! Merci également à Marion et Simon pour les bons moments passés ensemble et qui m'ont permis de sortir de la thèse un instant. Enfin merci à tous les autres, Laetitia, Doriane, Marie, Jean-Baptiste, Thomas et Eliot pour tous les bons moments passés ensemble.*

*Merci à tous !*

# Communications Scientifiques

## Articles scientifiques

Cardin G, Ripoche I, Poupet C, Bonnet M, Veisseire P, Chalard P, Chauder A, Saunier E, Priam J, Bornes S, Rios L. Development of an innovative methodology combining chemical fractionation and *in vivo* analysis to investigate the biological properties of cheese. *PLoS One*. 2020;15(11):1–16. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242370>

Cardin G, Poupet C, Bonnet M, Veisseire P, Ripoche I, Chalard P, Chauder A, Saunier E, Priam J, Bornes S, Rios L. A Mechanistic Study of the Antiaging Effect of Raw-Milk Cheese Extracts. *Nutrients*. 2021;13(897):1–26. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6643/13/3/897>

## Communications orales

**Animation G-RREMI**, par visioconférence, 26 juin 2021

Cardin G. et Rios L.

Développement d'une stratégie pour la recherche de molécules bioactives dans le fromage

## Communications affichées

- Congrès

**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.

- **Visites institutionnelles et vulgarisation scientifique**

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

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**

Cardin G. Chimie et biologie, amies pour la vie ?

## Notations et abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

AOC : Appellation d'Origine Contrôlée

AOP : Appellation d'Origine Protégée

ARN : Acide Ribonucléique

*C. elegans* : *Caenorhabditis elegans*

CGC : *Caenorhabditis* Genetic Center

CMP : caséinomacropéptide

DAF : abnormal DAuer Formation

dNTP : Désoxyribonucléotide triphosphate

*E. coli* : *Escherichia coli*

EFS : Etablissement Français du Sang

EPS : exopolysaccharide

ESI +/- : ElectroSpray Ionisation  
positive/negative

FBS : fetal bovine serum

FOXO : Forkhead Box O

FUdR : Fluoro desoxyuridine

GC-MS : Gaz chromatography – mass  
spectrometry

GFP : Green Fluorescent Protein

Gln : glutamine

GOI : Gene Of Interest

GRAS : Generally Recognised As Safe

HK : Heat-Killed

HPLC : High Performance Liquid  
Chromatography

IDF : International Dairy Federation

IGF : Insulin-like Growth Factor

IGP : Indication d'Origine Protégée

ILR : Insulin-Like Receptor

JNK : c-Jun N-terminal Kinase

LB : Lysogeny broth

LC-MS : Liquid chromatography – mass  
spectrometry

M : concentration Molaire

MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase

mL : millilitre

mM : milli molaire

m/Z : rapport masse sur charge

NaCl : Sodium Chloride

NaOH : Sodium Hydroxyde

NGM : Nematode Growth Medium

NTC : negative control

PBMC : Cellules mononuclées du sang  
périphériques

PCR : Polymerase Chain Reaction

PMA : phorbol myristate acetate

qPCR : quantitative PCR

qsp : quantité suffisante pour

RNAi : ARN interférent

ROS : Reactive Oxygene Species

rpm : Round Per Minute

RPMI : Roswell Park Memorial Institute  
medium

RT : Reverse Transcription

SKN : SKiNhead

ssp : subspecies

T<sub>m</sub> : temperature of melting

TNF- $\alpha$  : facteur de nécrose tumorale

uHPLC : Ultra High Performance Liquid  
Chromatography

W4M: Workflow4Metabolomics

°C : Degré Celsius



# Sommaire

<b>Résumé.....</b>	<b>3</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>5</b>
<b>Remerciements .....</b>	<b>7</b>
<b>Communications Scientifiques.....</b>	<b>10</b>
<b>Notations et abréviations.....</b>	<b>12</b>
<b>Sommaire .....</b>	<b>14</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>17</b>
<b>Liste des tableaux .....</b>	<b>18</b>
<b>Introduction générale .....</b>	<b>21</b>
<b>Première partie : État de l'art .....</b>	<b>29</b>
<b>Chapitre 1. La nature comme source de composés bioactifs innovants .....</b>	<b>31</b>
1. Recherche et valorisation de substances naturelles bioactives .....	32
2. Sélection de ressources naturelles renfermant potentiellement des métabolites d'intérêt .....	33
3. Extraction des métabolites à partir de la ressource sélectionnée .....	34
3.1. Préparation de la ressource en vue de l'extraction .....	34
3.2. Obtention d'extraits.....	34
4. Mise en évidence de nouveaux métabolites d'intérêt .....	35
5. Étude de l'activité biologique de métabolites et/ou fractions .....	37
<b>Chapitre 2. Les microorganismes comme nouvelle source de biomolécules d'intérêt .....</b>	<b>40</b>
1. Un nouvel intérêt pour les microorganismes et leurs métabolites .....	40
1.1. Les microorganismes : un outil de biotechnologie .....	40
1.2. Sélection des microorganismes pour la recherche de métabolites d'intérêt .....	41
2. Les aliments fermentés .....	42
2.1. Définition .....	42
2.2. Des aliments fermentés devenus des aliments santé.....	43
<b>Chapitre 3. Un aliment fermenté particulier : le fromage .....</b>	<b>45</b>
1. Du lait au fromage : l'impact des étapes du circuit de fabrication du fromage sur sa composition chimique et sa biodiversité microbienne.....	46
1.1. Le lait .....	48
1.1.1. Composition du lait.....	48
1.1.2. Les facteurs influençant la biodiversité microbienne et la composition chimique du lait... 50	
1.2. Les principaux traitements utilisés pour réduire la flore microbienne du lait.....	51
1.3. Le caillage du lait .....	53
1.4. L'étape de salage.....	56
1.5. L'affinage du fromage .....	57
2. Le fromage comme source de microorganismes et de métabolites à effet santé .....	58
<b>Chapitre 4. Développement d'une stratégie pour la recherche et l'étude de métabolites bioactifs dans le fromage.....</b>	<b>59</b>
1. Sélection du modèle d'étude et des conditions d'extractions des métabolites .....	61
1.1. Sélection du fromage à étudier .....	61
1.2. Développement et validation de l'étape d'extraction.....	61
2. Choix d'un modèle biologique pour l'étude du vieillissement .....	64

2.1.	<i>Caenorhabditis elegans</i> , un modèle <i>in vivo</i> pour l'étude de longévité.....	64
2.1.1.	Présentation des principales voies impliquées dans la sénescence du ver .....	65
2.1.2.	La voie DAF-2/Insulin-like receptor (ILR).....	66
2.1.3.	p38 MAPK, une voie des Mitogen-Activated Protein Kinase .....	67
2.2.	Suivi de la production de radicaux libres par des leucocytes humains.....	67
3.	Conclusion.....	68

## **Deuxième partie : Etude expérimentale..... 71**

1.	Préparation du fromage et du lait de chèvre .....	73
1.1.	Fromage.....	73
1.2.	Cryobroyage du fromage lyophilisé .....	73
1.3.	Lait de chèvre .....	73
2.	Extraction du fromage lyophilisé et du lait lyophilisé .....	73
2.1.	Extraction du fromage .....	73
2.1.1.	Extraction des constituants apolaires .....	75
2.1.2.	Procédé d'extraction I .....	75
2.1.3.	Procédé d'extraction II .....	76
2.1.4.	Procédé d'extraction III .....	76
2.2.	Extraction du lait .....	77
2.2.1.	Extraction des constituants apolaires .....	77
2.2.2.	Extraction fractionnée du lait .....	78
3.	Évaluation de l'activité biologique des extraits .....	79
3.1.	Expérimentation <i>in vivo</i> avec le modèle <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	79
3.1.1.	Culture d' <i>Escherichia coli</i> OP50 vivant et préparation de la bactérie « Heat-Killed » .....	79
3.1.2.	Souches de <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	79
3.1.3.	Entretien de <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	80
3.1.4.	Synchronisation de la population de <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	80
3.1.5.	Étude de la longévité des vers en présence des extraits de fromage ou de lait .....	81
3.1.6.	Étude de l'impact des extraits de fromage ou de lait sur la survie du ver sur milieu oxydant 82	
3.1.7.	Étude de l'impact des extraits de fromage sur la translocation du facteur de transcription DAF-16::GFP .....	83
3.1.8.	Détermination de l'expression des gènes d'intérêt .....	84
3.1.8.1.	Incubation des vers avec les extraits de fromage .....	84
3.1.8.2.	Extraction des ARN.....	84
3.1.8.3.	Reverse transcription des ARN en ADNc.....	85
3.1.8.4.	PCR quantitative.....	86
3.2.	Etude <i>in vitro</i> .....	87
3.2.1.	Viabilité cellulaire (leucocytes humains) .....	87
3.2.2.	Suivi de la production de radicaux libres par les leucocytes humains .....	87
3.3.	Analyses statistiques.....	88
4.	Étude de la composition chimique des extraits de fromage et de lait.....	88
4.1.	Analyse GC-MS des acides gras de l'extrait apolaire issu du fromage .....	88
4.1.1.	Dérivatisation des acides gras de l'extrait apolaire en ester.....	88
4.1.2.	Paramètres d'analyse en GC-MS .....	88
4.2.	Analyse LC-MS des extraits aqueux et éthanoliques de fromage et de lait.....	89
4.2.1.	Séparation de la partie « grasse » de l'extrait éthanolique .....	89
4.2.2.	Préparation des échantillons pour analyse LC-MS.....	90
4.2.3.	Paramètres d'analyse LC-MS.....	90
4.3.	Extraction des pics des chromatogrammes LC-MS et prétraitement des données en vue de l'étude comparative des profils chimiques d'extraits.....	91

## **Troisième partie : Résultats..... 95**

**Chapitre 1 : Développement d'une stratégie par bioguidage permettant l'étude de l'impact d'un caillé lactique caprin et de ses fractions sur la longévité du nématode *Caenorhabditis elegans*. 97**

**Chapitre 2 : Détermination des mécanismes biologiques par lesquels les extraits issus du**

<b>fromage étudié induisent une augmentation de la longévité du nématode <i>Caenorhabditis elegans</i> .....</b>	<b>125</b>
<b>Chapitre 3 : Étude de la composition chimique de 4 extraits de fromages définis précédemment comme biologiquement actifs.....</b>	<b>165</b>
1. Analyse de la composition en acides gras de l'extrait apolaire de fromage de chèvre .....	165
2. Développement d'un outil d'analyse comparative des compositions des extraits non apolaires issus des fromages et du lait de chèvre .....	168
2.1. Détermination de la composition chimique des extraits.....	170
2.2. Analyse comparative des compositions chimiques des extraits.....	170
2.2.1. Extraction et traitement des données .....	170
2.2.2. Analyse comparative des extraits .....	171
2.3. Mise en relation de la composition chimique des extraits avec leurs activités biologiques ..	178
<b>Quatrième partie : Discussion et perspectives.....</b>	<b>181</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>191</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>211</b>
<b>Annexe 1. Données de la littérature recensant les activités biologiques bénéfiques pour la santé humaine et animale attribuées aux microorganismes et/ou à leurs métabolites.....</b>	<b>212</b>
<b>Annexe 2. Préparation des solutions et milieux de culture .....</b>	<b>215</b>
<b>Annexe 3. Script RMarkdown pour l'analyse des données de longévité du ver.....</b>	<b>218</b>

## Liste des figures

Figure 1 : Démarche chimioguidée pour rechercher une famille moléculaire spécifique, à partir d'une ressource naturelle .....	36
Figure 2 : Démarche bioguidée pour rechercher des métabolites présentant une activité biologique spécifique, à partir d'une ressource naturelle.....	37
Figure 3 : Circuit de fabrication des différents types de fromage (pâtes molles, pâtes pressées, pâtes persillées, pâtes pressées cuites, etc.).....	47
Figure 4 : Les différentes phases du lait.....	49
Figure 5 : Structure schématique d'une micelle de caséine du lait. ....	49
Figure 6 : Abondance relative des bactéries les plus communes détectées dans les laits crus de vache, brebis, bufflonne ou humain. ....	50
Figure 7 : Les différentes méthodes de traitement pour réduire la flore microbienne du lait. .	51
Figure 8 : Schématisation du processus intervenant lors de la coagulation acide des caséines du lait.....	54
Figure 9 : Schématisation du processus intervenant au cours de la coagulation enzymatique des caséines du lait. ....	55
Figure 10 : Les différents rôles du sel dans le fromage.....	56
Figure 11 : Evolution du nombre de personnes âgées de plus de 60 ans dans le monde entre 1950 et 2050 .....	59
Figure 12 : Evolution du nombre de personnes âgées dépendantes en France .....	60
Figure 13 : Classement qualitatif de différents solvants selon leur polarité .....	63
Figure 14 : Schéma de l'extraction fractionnée appliquée au cours de la thèse .....	63
Figure 15 : Voie DAF-2/DAF-16 (voie insulino-like pathway) .....	66
Figure 16 : Voie p38 MAPK.....	67
Figure 17 : Schéma du bioguidage réalisé dans le cadre de la thèse.....	69
Figure 18 : Préparation des extraits de fromage.....	74
Figure 19 : Préparation des extraits de lait.....	77
Figure 20 : Schéma récapitulatif de la série d'extractions chimiques réalisée à partir du caillé lactique de chèvre.....	98
Figure 21 : Les différents paramètres des courbes de survie permettant d'évaluer l'impact de la supplémentation du milieu de culture du nématode avec un extrait de fromage .....	99
Figure 22 : Taux de survie relatif de la souche sauvage N2 de <i>C. elegans</i> en condition oxydante, après 5 jours d'incubation sur un milieu supplémenté avec fromage lyophilisé lot 1, fromage lyophilisé lot 2 et l'extrait apolaire lot 2 ( <b>A</b> ), ou l'extrait aqueux W40 lot 1, W70 lot 1, W40 lot 2 et W70 lot 2 ( <b>B</b> ).....	164
Figure 23 : Chromatogramme des esters d'acide gras de l'extrait apolaire obtenu à la suite d'une analyse par GC-MS. ....	166
Figure 24 : Représentation du « profil filtré » de l'extrait W40 (obtenu par extraction à l'eau à 40 °C du fromage, selon le procédé II). ....	172
Figure 25 : Représentation des deux classes d'extraits n°1 et n°3 sous forme de cercle .....	177
Figure 26 : Représentation des deux classes d'extraits n°1 et n°2 sous forme de cercles qui se chevauchent partiellement.....	178
Figure 27 : Ensemble des signaux correspondant à des molécules pouvant être responsables de l'activité bénéfique et présents dans les extraits aqueux entraînant une survie du nématode en condition de stress oxydant (W40, W40 (4), W40 (6), WF, W70, W70 (4) et W70 (6)). .	179

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Consommation moyenne annuelle par habitants de 8 aliments fermentés dans plusieurs pays du monde .....	43
Tableau 2 : Composition moyenne de laits couramment utilisés pour la fabrication de fromage (g/L).....	48
Tableau 3 : Liste des souches de <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	79
Tableau 4 : Masse d'extrait sec (mg) à introduire dans le milieu gélosé pour obtenir le pourcentage massique (% , w/v) désirée lors des études sur <i>C. elegans</i> .....	81
Tableau 5 : Séquences des oligonucléotides utilisés comme amorces en PCR quantitative....	86
Tableau 6 : Rampe de température de la colonne au cours de l'analyse par GC-MS .....	89
Tableau 7 : Gradient d'élution eau/acétonitrile pour l'analyse par LC-MS .....	90
Tableau 8 : Paramètres appliquées pour l'extraction des pics des chromatogrammes à l'aide du logiciel XCMS®, et du prétraitement appliqué aux données pour les préparer en vue de l'analyse. ....	92
Tableau 9 : Rendements des extraits de lait en pourcentage (extrait apolaire du lait, lait délipidé, extrait au dichlorométhane, extrait à l'acétate d'éthyle, extrait à l'éthanol et résidu du lait) .....	163
Tableau 10 : Attribution des signaux détectés dans l'extrait apolaire. ....	167
Tableau 11 : Informations relatives à chaque extrait utilisé au cours de l'étude.....	169
Tableau 12 : « Pourcentage d'homologie » entre extraits comparés 2 à 2. ....	174
Tableau 13 : Ecart-type des distances intra-classe, et distances inter-classes. ....	176





*Introduction*

*générale*





Depuis toujours, l'Homme a eu recours à la nature pour subvenir à ses besoins, notamment en termes de nourriture, matériaux ou médicaments. Différents écrits ont relaté que tout au long de son histoire, l'Homme a notamment utilisé les plantes pour lutter contre diverses affections, conduisant au développement de plusieurs pharmacopées (Égypte, Amérique, Chine, etc.) [1–3]. Aujourd'hui encore, le secteur de la santé (animale et humaine) s'intéresse aux ressources naturelles pour découvrir et proposer de nouveaux principes actifs permettant de développer de nouveaux traitements. En effet, plus de la moitié des médicaments mis sur le marché français ces dernières années a un lien avec la nature (entre 2014 et 2020, plus de 50 % des autorisations de mise sur le marché (AMM) ont concerné des substances d'origine naturelle) [4]. Bien que ces principes actifs soient principalement issus des plantes, l'exploration de cette ressource est loin d'être achevée puisqu'il est estimé que seulement 15 % des végétaux ont été étudiés pour rechercher d'éventuelles propriétés thérapeutiques [5]. D'autres ressources naturelles restent quant à elles encore peu explorées, telle que la bioressource microbienne, pour laquelle il est estimé que moins de 1 % des microorganismes a été étudié pour leurs potentialités pharmacologiques [6]. Il a cependant été mis en évidence, au cours de différentes études (*in vitro* et *in vivo*), que plusieurs microorganismes peuvent présenter des effets bénéfiques sur la santé (propriétés anti-inflammatoires, propriétés antimicrobiennes, etc.) [7–9], entraînant ainsi un grand intérêt pour la recherche de nouvelles fonctionnalités biologiques potentielles au sein de cette biodiversité encore très largement inexplorée.

Le secteur en plein développement de la pharmabiotique s'intéresse aux microorganismes, afin de maîtriser et d'exploiter leur « potentiel santé » dans le but de développer de nouvelles solutions santé préventives ou curatives. De plus, la production de ces biomasses microbiennes d'intérêt peut se faire, jusqu'à l'échelle industrielle, par la mise en œuvre de systèmes (réacteurs) clos contrôlés (pH, température, composition du milieu, etc.). Ce process permet d'envisager de s'affranchir des problèmes liés à la saisonnalité ou aux aléas climatiques inhérents à la culture des plantes, et de garantir des productions optimales tout au long de l'année. Ces biomasses microbiennes, ainsi produites, pourront être utilisées dans différents bioprocédés (secteur agroalimentaire, secteur agronomique, production d'énergie ou dépollution, etc.). En plus de la production de biomasses microbiennes, il est possible d'induire, à l'échelle industrielle, la production spécifique de métabolites (molécules) microbiens d'intérêt, notamment ceux reconnus comme présentant des activités biologiques intéressantes [10]. Cette bio-production de métabolites spécifiques est notamment rendue possible par l'utilisation d'un bioprocédé particulier nommé induction (ou stress) métabolique [11–13]. Ce bioprocédé peut

permettre également la production, par des microorganismes spécifiques, de métabolites d'intérêt initialement mis en évidence chez les plantes, tout en s'affranchissant des contraintes inhérentes à l'utilisation de la biomasse végétale (disponibilité de la ressource, cultivabilité, saisonnalité, aléas climatiques, ravageurs, contamination/pollution éventuelle, disponibilité des parcelles de culture, etc.) [14]. Ces productions de biomasses microbiennes et de métabolites microbiens peuvent permettre de répondre à différents enjeux sociétaux (recherche de naturalité, de durabilité, de préservation des ressources, etc.). En ce qui concerne le secteur de la santé, les microorganismes et leurs métabolites pourraient participer, en tant que solution, au maintien et/ou au rétablissement de la santé des populations (humaines mais aussi animales domestiques) vieillissantes [15].

Dans les pays dits « développés », l'amélioration des conditions de vie et les progrès de la médecine ont conduit à l'allongement de la durée de vie de leur population. Au cours des dernières décennies, la part de la population mondiale âgée de plus de 60 ans a fortement augmenté (de 205 millions en 1950 à environ 810 millions en 2012). A l'horizon de 2050, il est estimé qu'environ 2 milliards d'êtres humains auront plus de 60 ans [16]. Ce constat est également réalisé en France, où la part des plus de 65 ans dans la population augmente constamment (13.4 % en 1975, 20.3 % en 2020) [17]. Cependant, des études ont montré que cette population ne vieillit pas forcément en bonne santé [18]. Les personnes âgées sont sujettes à diverses affections, souvent couplées à une perte d'autonomie, réduisant d'autant leur qualité de vie [19]. Le vieillissement, bien qu'étant un processus physiologique « normal », se traduit par une série de transformations entraînant notamment la dégénérescence de cellules, d'organes, ce qui provoque l'affaiblissement et le ralentissement des fonctions vitales et des modifications d'ordre physique, physiologique et psychique [20]. Du fait de cette situation, le secteur de la santé cherche à améliorer les conditions de vie de ces personnes âgées en permettant à la population de « vieillir en meilleure santé », notamment en luttant contre le développement d'affections et/ou de dépendance (problèmes de mobilité). Pour cela, les chercheurs s'intéressent aux différents processus biologiques évoluant au cours du vieillissement, dont notamment l'inflammation, le stress oxydatif, la sénescence cellulaire, etc. [21,22]. Au cours des travaux de cette thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés aux processus inflammatoires et oxydatifs. La recherche de solutions, notamment la recherche de métabolites actifs, agissant sur ces deux processus biologiques présente un intérêt majeur. Afin d'identifier de nouveaux métabolites bioactifs d'intérêt, l'une des pistes a été d'étudier la nature et particulièrement les bioressources encore largement inexplorées, tels que les microorganismes.

La biodiversité microbienne étant très riche (plus de 1 trillion de microorganismes), il est nécessaire de cibler efficacement les microorganismes à étudier [23]. Pour réduire le champ des microorganismes « méritant » d'être étudiés, nous avons choisi d'utiliser la pathogénicité comme critère de sélection. En effet, en nous intéressant au potentiel santé des microorganismes et/ou de leurs métabolites, nous avons donc exclu de nos investigations les microorganismes reconnus comme pathogènes (pour l'homme et/ou l'animal). Afin de réduire encore le nombre des microorganismes à étudier nous avons aussi choisi, au sein des microorganismes définis comme non pathogènes, de nous focaliser sur ceux issus et/ou utilisés dans le domaine alimentaire et donc régulièrement consommés par l'Homme sans présenter de risques pour sa santé. De ce fait, nous avons décidé de nous intéresser aux microorganismes utilisés et/ou retrouvés dans les aliments et boissons fermentés (aliments occupant une place de plus en plus importante dans notre alimentation) [24]. La présence de ces microorganismes (et de leurs métabolites) dans ces aliments les rend particulièrement intéressants car certaines études suggèrent qu'ils pourraient agir favorablement sur la santé humaine [25,26]. Parmi les aliments fermentés, nous retrouvons le fromage, qui occupe une place importante dans la culture gastronomique française. Même s'il a souvent été décrié car pouvant être perçu comme trop gras, trop salé [27,28], ou pour des raisons sanitaires (par exemple présence de *Listeria monocytogenes*) [29], certaines études suggèrent néanmoins que des microorganismes du fromage (issus des genres *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, etc.) possèdent des effets bénéfiques sur les processus inflammatoires ou oxydatifs lorsqu'ils sont étudiés de manière isolée [7,30–32]. Cependant, très peu de recherches sont menées concernant les effets santé de ces microorganismes lorsqu'ils sont présents dans la matrice alimentaire. Le « potentiel santé » du fromage, de ses microorganismes et de leurs métabolites, reste donc à explorer. Afin de disposer d'une biodiversité microbienne (d'origine fromagère) la plus variée, il nous a semblé judicieux de nous focaliser sur les fromages produits à partir de lait cru. Leur riche biodiversité microbienne permet d'assimiler cet aliment à un bioréacteur dans lequel les microorganismes produiront des métabolites. Le fromage au lait cru apparaît donc comme une matrice alimentaire de choix pour la recherche de nouveaux métabolites microbiens bioactifs qui soient naturels et valorisables.

C'est dans ce contexte que les travaux de cette thèse ont eu pour objectif de rechercher et d'identifier des métabolites dans des aliments fermentés, et en particulier dans les fromages au lait cru, qui puissent agir sur les processus inflammatoires et oxydatifs. Cette recherche nécessite d'établir et de mettre en œuvre une stratégie en 3 étapes détaillées ci-après :

- Extraction : Les métabolites ne pouvant pas être étudiés directement dans le fromage, une étape d'extraction est nécessaire afin de les isoler. Cela permet d'obtenir un ou plusieurs extraits (ou fractions) de fromage, correspondant à des mélanges de métabolites.
- Criblage d'activité biologique : Le criblage de l'activité biologique de ces extraits sera ensuite réalisé *in vivo* et *in vitro*, afin de mettre en évidence leur efficacité sur les processus biologiques liés au vieillissement.
- Caractérisation de la composition chimique : Dans le cas où des extraits présenteraient une activité intéressante, leur composition sera caractérisée de manière à isoler et à identifier le ou les métabolites responsables de cette activité biologique.

Ces étapes sont détaillées dans ce mémoire de thèse, qui se compose de quatre parties :

- La première correspond à une synthèse de la littérature scientifique divisée en quatre chapitres :
  - Dans le premier chapitre nous nous intéresserons aux ressources naturelles et aux méthodologies d'extraction et de criblage des extraits et métabolites.
  - Dans un second chapitre nous nous intéresserons à la biomasse microbienne, ainsi qu'aux aliments fermentés et à leurs effets sur la santé.
  - Le troisième chapitre sera focalisé sur un aliment fermenté en particulier : le fromage. Nous nous intéresserons notamment à l'impact des différentes étapes de la production fromagère sur sa biodiversité microbienne et sur sa composition chimique. Ces deux paramètres jouent un rôle important dans la production de métabolites secondaires potentiellement actifs.
  - Enfin, le chapitre 4 permettra de présenter les points importants à prendre en considération pour proposer une stratégie efficace de recherche de métabolites bioactifs à partir du fromage.
- La seconde partie du manuscrit traitera des choix expérimentaux qui ont été réalisés afin de mener les différentes études.
- La troisième partie présentera les différents résultats obtenus au cours de cette thèse.
- Ces résultats seront ensuite discutés dans la dernière partie du manuscrit, et des perspectives à ce travail seront envisagées.





*Première partie :*

*État de l'art*





## Chapitre 1.

# La nature comme source de composés bioactifs innovants

La nature est composée d'un grand nombre de biotopes (milieux terrestres, marins, extrémophiles, etc.) rassemblant de nombreuses formes de vie (plantes, animaux, champignons, microorganismes) constituant la biodiversité. Ces organismes ont la capacité de produire différentes molécules naturelles (également appelées métabolites) nécessaires pour répondre à leurs besoins (adaptation aux conditions changeantes de leur environnement, interactions entre individus, résistance à un stress, mécanismes de défense contre un prédateur, etc.). Ces molécules seront d'autant plus diversifiées que les besoins d'un même individu varient en fonction de l'environnement dans lequel il évolue. Ainsi, cette riche diversité biologique a conduit à une diversité moléculaire d'autant plus grande, appelée chimiodiversité. Ces molécules font partie de l'ensemble des « substances naturelles », c'est-à-dire l'ensemble des molécules présentes dans la nature (qu'elles soient d'origine animale, végétale, microbienne ou minérale) [33].

Depuis toujours, l'Homme a utilisé la nature pour subvenir à ses besoins, notamment en termes de nourriture, matériaux ou médicaments. Plusieurs écrits relatent que l'Homme a, au cours de son histoire, utilisé les propriétés médicinales des plantes afin de lutter contre différentes affections [1,2,34]. Cette pratique a conduit au développement de pharmacopées, dont la plus ancienne remonterait à environ 60000 ans en Asie [1]. Cependant, il faudra attendre plusieurs siècles et le développement de la chimie (extraction, analyse, identification), et de la biologie (compréhension des processus et fonctions biologiques) pour comprendre que les substances naturelles sont à l'origine de ces effets thérapeutiques.

Les premières extractions de métabolites d'origine végétale débutèrent dès la fin du XVIII<sup>ème</sup> siècle [35]. Dès lors, le développement des techniques d'extraction augmenta l'utilisation de substances naturelles. Avec le développement de la chimie de synthèse au XX<sup>ème</sup> siècle, et en particulier de l'hémisynthèse (qui consiste à synthétiser des molécules à partir de composés naturels (précurseurs) possédant déjà une partie de la molécule visée) l'extraction de substances naturelles n'était plus systématique pour obtenir les molécules recherchées, mais le plus souvent employée pour obtenir les précurseurs nécessaires pour leur synthèse. Celle-ci

était alors privilégiée lorsqu'elle était plus adaptée, que ce soit pour des raisons économiques, pour l'obtention de meilleurs rendements ou encore pour des problèmes de disponibilité de la ressource naturelle [36]. Dans ce cas de figure, la nature servait alors de source d'inspiration pour le chimiste afin d'identifier les structures des métabolites et de les reproduire par synthèse à l'échelle du laboratoire et à l'échelle industrielle. Cependant, depuis quelques années le recours à l'extraction n'a eu de cesse de s'amplifier. Ce regain d'intérêt pour la nature, comme source de molécules, est également motivé par les grands défis sociétaux d'aujourd'hui (recherche de naturalité, de durabilité, de préservation de l'environnement et des ressources fossiles, recherche de nouveaux traitements, exploration de matrices pour découvrir de nouvelles structures et applications, etc.). Cela a conduit au développement des méthodes d'extraction, de purification et d'analyse afin qu'elles soient plus performantes. Cependant, les ressources naturelles restent encore majoritairement inexplorées, en particulier pour des propriétés de santé : seulement 15 % des végétaux et moins de 1 % des microorganismes ont été étudiés à ce jour pour rechercher d'éventuelles propriétés thérapeutiques [5,6]. De nombreuses substances naturelles restent donc à étudier pour leurs fonctionnalités biologiques potentielles. Cette recherche nécessite la mise en place d'une stratégie permettant de mettre en évidence, d'extraire et d'isoler ces substances à partir de ressources naturelles et d'identifier leurs activités biologiques afin de les valoriser.

## **1. Recherche et valorisation de substances naturelles bioactives**

La recherche et la valorisation de substances naturelles bioactives d'intérêt (c'est-à-dire présentant une activité biologique recherchée) s'effectuent selon une méthodologie comportant 4 étapes :

- Identification/sélection d'une ressource naturelle ayant une forte probabilité de renfermer des métabolites bioactifs.
- Mise en œuvre d'une méthodologie d'extraction spécifique qui va permettre d'obtenir un extrait contenant un mélange des métabolites.
- Séparation des métabolites du reste de l'extrait (fractionnement), à l'aide de procédés chimiques et/ou physiques, permettant d'isoler les métabolites d'intérêt pour les obtenir purs.

- Étude de l'activité biologique des métabolites (purs ou sous forme d'extrait) à l'aide de tests biologiques *in vitro* et *in vivo*.

Ces 4 étapes sont présentées en détail dans la suite de ce chapitre.

## **2. Sélection de ressources naturelles renfermant potentiellement des métabolites d'intérêt**

Compte tenu de l'étendue de la biodiversité, il est impossible d'envisager une exploration exhaustive, ce qui implique de faire un choix et de sélectionner de manière optimale la/les ressource(s) naturelle(s) à étudier. Il est donc nécessaire d'acquérir des informations permettant d'identifier les ressources ayant une forte probabilité de renfermer des métabolites bioactifs d'intérêts. Pour atteindre cet objectif, 3 approches, parfois complémentaires, peuvent être mises en place : une approche ethnobotanique et ethnopharmacologique, une approche biologique et une approche écologique.

- L'approche ethnobotanique et ethnopharmacologique référence et étudie la véracité des savoirs et pratiques des populations vernaculaires ayant recours aux ressources naturelles à des fins thérapeutiques [37,38]. L'objectif est donc d'utiliser les connaissances mises à profit par les médecines traditionnelles pour identifier les ressources susceptibles de posséder des activités biologiques d'intérêt, et donc de contenir des métabolites bioactifs.
- L'approche biologique consiste à utiliser les connaissances acquises sur les organismes et leur fonctionnement afin de déterminer les substances pouvant agir sur des cibles biologiques spécifiques, en lien avec l'activité recherchée
- L'approche écologique, dans laquelle les relations entre les êtres vivants et/ou avec l'environnement sont des pistes permettant de déduire les informations requises afin de sélectionner la ressource.

Ces deux dernières approches sont particulièrement adaptées pour des ressources non végétales, ou des plantes non décrites par les médecines traditionnelles, et dont les informations ne peuvent être recueillies à l'aide de l'approche ethnobotanique et ethnopharmacologique. Enfin, à ces 3 approches s'ajoute une autre méthode de sélection : le criblage aléatoire, qui consiste à étudier l'activité de ressources naturelles (choisies sur différents critères, telle que leur origine géographique) récoltées dans une région, sur différentes cibles biologiques [2]. Les

ressources présentant une forte activité sont sélectionnées afin d'espérer isoler des métabolites actifs. Cette dernière stratégie reste néanmoins fastidieuse dans sa mise en œuvre et présente un aspect « pêche à la ligne » du fait de son caractère aléatoire, demandant de réaliser de nombreux prélèvements et tests biologiques pour espérer mettre en évidence une activité intéressante.

Une fois sélectionnée, la ressource naturelle devra être extraite et fractionnée afin d'isoler et d'étudier les métabolites la composant.

### **3. Extraction des métabolites à partir de la ressource sélectionnée**

L'extraction des métabolites consiste à les isoler de la ressource à l'aide d'un ou plusieurs solvants dans lesquels elles sont solubles. Cela conduira à l'obtention d'un extrait pour chaque solvant employé. La sélection des solvants à utiliser est réalisée selon le critère de polarité. L'extraction sera effectuée à partir de la ressource dans son ensemble, ou de parties spécifiques de cette ressource. Pour cela, 2 étapes sont nécessaires :

#### **3.1. Préparation de la ressource en vue de l'extraction**

La préparation de la matrice sélectionnée est une étape cruciale et indispensable. Cette étape sera déterminante pour optimiser l'extraction, tant en quantité qu'en qualité. Cette préparation peut comporter deux étapes :

- Le séchage de la ressource (si cela est possible sans risquer de perdre les métabolites bioactif(s) d'intérêt(s) (dégradation thermique, molécule volatile, etc.)), qui permet d'éliminer l'eau présente dans la ressource. Cela permet ensuite de faciliter l'extraction par solvant mais aussi de concentrer les métabolites dans la ressource et de stabiliser certaines molécules (inhibition de l'activité enzymatique, réduction de l'activité de l'eau, etc.) [39].
- Le broyage, afin d'augmenter à la fois la surface de contact entre les fragments de la ressource et le solvant, et sa pénétration dans la ressource [40,41].

#### **3.2. Obtention d'extraits**

Une fois la préparation de la ressource réalisée, l'étape d'extraction proprement dite pourra être effectuée. Cela sera réalisé en deux temps :

- L'extraction à l'aide d'un solvant (dont la polarité couvrira celle des métabolites recherchés s'ils sont connus) ou avec une succession de solvants de polarités différentes (de manière à balayer l'ensemble de la gamme de polarités) lorsqu'il n'y a que peu ou pas de renseignements sur la composition de la ressource (et donc sur la polarité des métabolites la composant). Une fois l'extraction réalisée on obtient à minima un extrait liquide, brut, qui sera séparé entièrement de la ressource (filtration)
- L'évaporation du solvant, si cela est nécessaire, et qui va permettre :
  - De concentrer les métabolites
  - D'optimiser la conservation de l'extrait
  - D'obtenir un extrait sec, qui peut être resolubilisé dans le solvant de notre choix en vue de futures analyses (chimiques ou biologiques).

#### **4. Mise en évidence de nouveaux métabolites d'intérêt**

A la suite de l'étape d'extraction, un ou plusieurs extrait(s) est/sont obtenu(s). Chacun est constitué d'un mélange de molécules dont certaines sont susceptibles de posséder l'activité biologique recherchée. Afin d'identifier et de caractériser un ou plusieurs métabolites bioactifs, il est nécessaire de les isoler du reste de l'extrait. Pour cela, l'extrait sera fractionné par l'utilisation de procédés chimiques (utilisation de solvants) et/ou physiques (techniques physiques de séparation). Cela permet d'obtenir différentes fractions à partir de l'extrait initial (contenant chacune un nombre de molécules inférieur à celui de l'extrait brut de départ). Les fractions contenant des métabolites d'intérêt seront elles-mêmes à leur tour fractionnées (sous-fractionnement). Afin de sélectionner les fractions ou sous-fractions à conserver à chaque étape, il existe 2 démarches permettant la mise en évidence des métabolites d'intérêt.

- **La démarche chimioguidée**, qui consiste à fractionner l'extrait, avec pour objectif de suivre et d'étudier une famille moléculaire désirée car connue pour posséder des activités biologiques recherchées (alcaloïdes, flavonoïdes etc.) (Figure 1). L'objectif est de découvrir et d'isoler de nouveaux membres de cette famille possédant une activité ciblée et/ou qui soient plus actifs que ceux déjà identifiés. Les fractions obtenues à chaque étape du fractionnement seront analysées à l'aide de méthodes analytiques physico-chimiques spécifiques permettant de mettre en évidence la présence ou l'absence de la famille de molécules recherchées (crible physico-chimique). Cette démarche permettra

d'obtenir les plus petites fractions possibles (en termes de nombre de constituants moléculaires) ne contenant que des membres de la famille moléculaire désirée. A la suite de cela, ces molécules seront analysées : *i*) chimiquement de manière à déterminer leur structure en souhaitant identifier de nouveaux membres et/ou *ii*) biologiquement de manière à déterminer si ces métabolites isolés sont porteurs de la (des) activité(s) biologique(s) recherchée(s) (crible(s) biologique(s)).

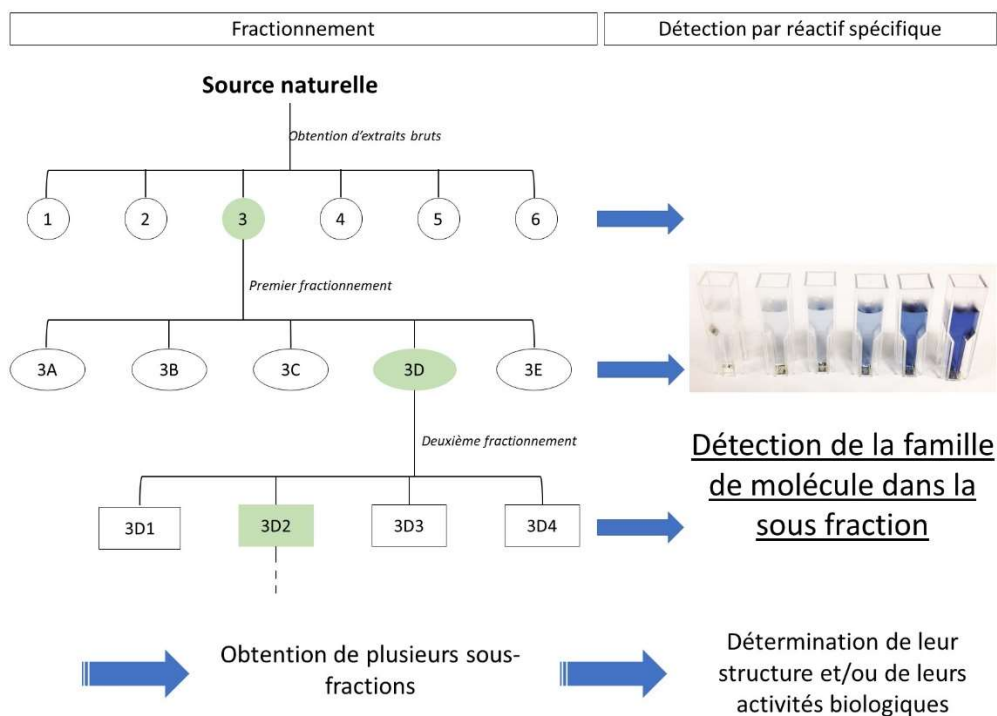


Figure 1 : Démarche chimio-guidée pour rechercher une famille moléculaire spécifique, à partir d'une ressource naturelle

- **La démarche bioguidée**, qui consiste à fractionner l'extrait dans le but d'isoler des métabolites présentant une activité biologique spécifique, sans distinction de familles moléculaires (Figure 2) [42,43]. Les fractions obtenues à chaque étape du fractionnement seront analysées biologiquement de manière à évaluer leur activité (sur un (des) crible(s) biologique(s)). Cette démarche permettra d'obtenir les plus petites fractions possibles (en termes de nombre de constituants moléculaires) dotées de l'activité biologique recherchée. Le profil phytochimique de ces différentes fractions sera également étudié.

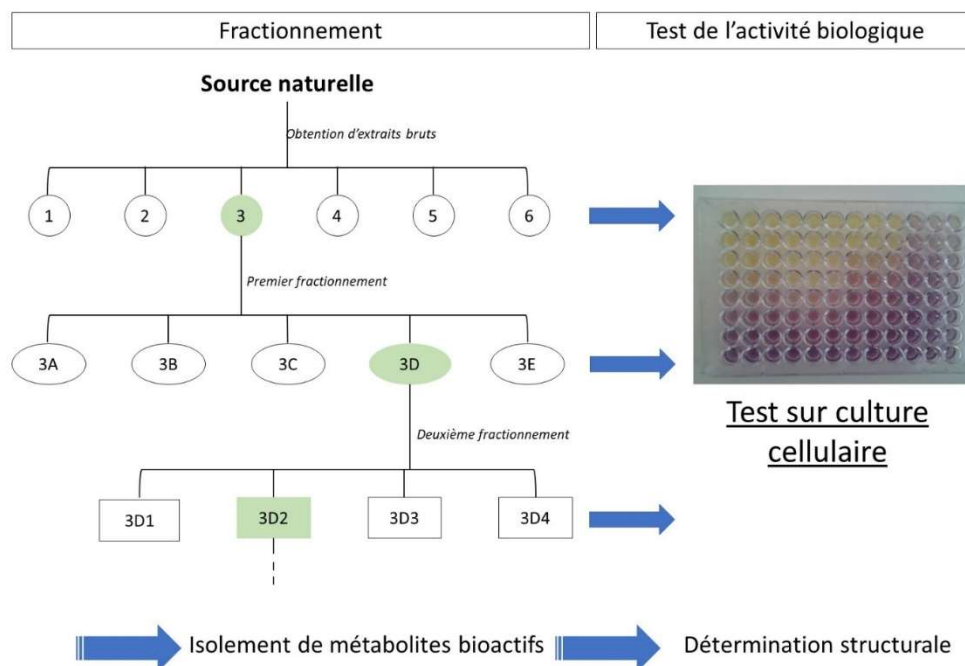


Figure 2 : Démarche bioguidée pour rechercher des métabolites présentant une activité biologique spécifique, à partir d'une ressource naturelle

Afin de cribler biologiquement les fractions obtenues, il est nécessaire de sélectionner judicieusement le(s) test(s) à réaliser afin de mettre en évidence de manière efficace l'effet des métabolites.

## 5. Étude de l'activité biologique de métabolites et/ou fractions

La recherche et la valorisation des substances naturelles nécessitent de déterminer leurs activités biologiques. Afin de réaliser cette évaluation, il est nécessaire d'utiliser des tests biologiques pertinents. Pour cela, il existe 2 types de tests biologiques : des tests *in tubo/in vitro* et des tests *in vivo*.

- Les tests *in tubo* permettent d'évaluer l'activité biologique à l'aide d'un test physico-chimique ou biochimique (par exemple, le suivi de l'activité d'un enzyme). Les tests *in vitro* sont réalisés sur des lignées cellulaires cultivées en laboratoire ou à partir d'organes isolés d'un organisme entier. Ces tests sont utilisés en tant que crible biologique pour effectuer une première évaluation de l'activité biologique, permettant de valider l'activité biologique et/ou d'écarter des molécules présentant un effet cytotoxique. Les



tests *in vitro* sont également très employés pour réaliser des études mécanistiques afin d'approfondir les connaissances sur l'activité des métabolites. Cependant, ils ne permettent pas de prédire totalement l'influence qu'aura un métabolite (pur ou sous forme d'extrait) au sein d'un organisme, c'est pourquoi des études sur des modèles *in vivo* sont nécessaires [44].

- Les tests *in vivo* permettent d'évaluer l'activité biologique dans un organisme vivant entier (animal, végétal, etc.). Ils sont souvent employés afin de valider l'activité biologique observée *in vitro*, d'évaluer les éventuels effets délétères ou toxiques des métabolites, et de caractériser leurs mécanismes d'action (physiologique et biochimique) dans un organisme entier [44]. La réalisation de ces tests laisse ensuite envisager la mise en œuvre d'études cliniques (une forme particulière de test *in vivo*), afin de définir les modes d'administration du métabolite, son activité réelle, sa résilience, sa pharmacocinétique, ses effets secondaires, la dose requise, etc. Cette étape est indispensable dans le domaine pharmaceutique pour obtenir les informations requises sur un métabolite afin de recevoir l'autorisation de mise sur le marché du médicament correspondant.

La sélection du test sera effectuée en fonction de l'étude à réaliser : le recours à un test de criblage permettra de mettre en évidence rapidement une activité biologique, tandis qu'un approfondissement des mécanismes biologiques sera effectué à l'aide d'un test d'objectivation biologique.

- Un criblage d'activité(s) biologique(s) consiste à évaluer rapidement l'activité biologique de métabolites ou de fractions afin de suivre et d'identifier ceux (celles) qui possèdent l'activité désirée. Pour être considéré comme un test de criblage celui-ci doit satisfaire aux critères suivants : *i*) être adapté au suivi de l'activité désirée ; *ii*) permettre une maîtrise des conditions expérimentales, assurant une fiabilité et une reproductibilité des tests (pouvant conduire à une automatisation de l'expérience) ; *iii*) être rapide à mettre en œuvre ; *iv*) être le moins onéreux possible. Les tests *in tubo* et *in vitro* seront donc souvent privilégiés pour réaliser l'étape de criblage de l'activité biologique de la série d'échantillons obtenue.
- L'objectivation biologique consiste à approfondir l'étude des mécanismes impliqués dans l'activité du métabolite ou de la fraction retenus lors du crible, notamment par la réalisation d'études mécanistiques (identification de la voie biologique, de la molécule

impliquée, etc.). La démarche *in vitro* est particulièrement employée pour cela, mais l'étude des mécanismes reste limitée à un nombre réduit de cellules (seules ou en co-culture). Le recours aux tests *in vivo* reste nécessaire pour étudier l'impact d'un point de vue physiologique et biochimique d'un métabolite ou d'une fraction sur un organisme entier (toxicologie, pharmacologie, etc.).

Certains modèles *in vivo*, comme la mouche *Drosophila melanogaster* ou le nématode *Caenorhabditis elegans*, sont de plus en plus utilisés afin de réaliser des études de criblage et d'objectivation biologique. Ces modèles sont notamment utilisés pour leur similitude avec l'Homme (génomique et protéique), qui permet de réaliser des études mécanistiques *in vivo* afin de comprendre les mécanismes d'action des métabolites et d'écarter ceux présentant un effet néfaste (par exemple, cytotoxicité). Ces modèles sont de plus en plus employés dans de nombreux domaines (génétique, développement, neurobiologie, toxicologie, interaction hôte-microorganismes, etc.) car ils permettent de réaliser des études rapidement, sont peu coûteux et permettent de réduire à la fois le nombre d'animaux utilisés et le nombre de tests réalisés [45]. Néanmoins, bien que ces modèles soient prometteurs et innovants pour réaliser des études *in vivo*, il n'est pas possible à ce jour de se passer complètement des tests sur mammifères pour la compréhension des mécanismes d'action des métabolites, en particulier lors du développement de produits de santé à destination de l'Homme.

Cette stratégie de recherche et de caractérisation des substances naturelles bioactives peut être mise en œuvre pour l'étude des différentes ressources naturelles, même celles encore inexploitées, telles que les microorganismes.

## Chapitre 2.

# Les microorganismes comme nouvelle source de biomolécules d'intérêt

Le terme « microorganisme » regroupe l'ensemble des organismes invisibles à l'œil nu. Cela comprend les bactéries, les mycètes (levures, moisissures, champignons), les microalgues, les protozoaires et les virus [46]. Depuis leurs premières descriptions au XVII<sup>ème</sup> siècle, de nombreux scientifiques (tels que Louis Pasteur) se sont intéressés à leurs effets sur la santé. Le XX<sup>ème</sup> siècle a permis l'avancée des connaissances sur les microorganismes, avec notamment la découverte de molécules aux propriétés antimicrobiennes (découverte de la pénicilline par Alexander Fleming en 1928), ouvrant la voie à la recherche et au développement des antibiotiques [47]. Plusieurs études ont également montré l'implication de microorganismes pour des effets sur la santé, que ce soit un rôle infectieux lors de certaines maladies (choléra aviaire, maladie du charbon, etc.), ou un rôle bénéfique (par exemple, l'interaction des microorganismes du microbiote intestinal (ensemble des microorganismes présents dans l'intestin) avec son hôte) [48–51]. Certains microorganismes sont par ailleurs utilisés en lien avec la lutte contre certaines affections (par exemple les probiotiques) [52]. Néanmoins, cette bioressource reste encore peu explorée en termes de source de métabolites bioactifs. Par conséquent, elle suscite un fort intérêt pour le secteur de la chimie des substances naturelles, mais également de la santé, aussi bien en tant qu'outil de biotechnologie (processus fermentaires, biocatalyse, bioconversion, usine métabolique, etc.), qu'en tant que nouvelle source de métabolites potentiellement bio actifs et valorisables.

### **1. Un nouvel intérêt pour les microorganismes et leurs métabolites**

#### **1.1. Les microorganismes : un outil de biotechnologie**

La bioressource végétale est très utilisée pour la recherche et l'identification de métabolites bio actifs d'intérêt d'origine naturelle. Cependant, l'utilisation et la valorisation des végétaux sont soumises à de nombreuses contraintes (disponibilité de la ressource, possibilité ou non de culture, saisonnalité, aléas climatiques, ravageurs, contaminations et pollutions

éventuelles, disponibilité des parcelles de culture, etc.). C'est pourquoi d'autres bioressources (microorganismes, organismes marins, etc.) sont explorées afin d'identifier et d'obtenir de nouveaux métabolites tout en s'affranchissant de ces contraintes. Les microorganismes en tant qu'outil de biotechnologie peuvent répondre à cette demande et aux enjeux du secteur de la santé. Certaines souches sont par ailleurs déjà employées par le secteur en plein développement de la pharmabiotique qui cherche à maîtriser et à valoriser leur potentiel dans le but de développer de nouvelles solutions santé (préventives ou curatives). Plusieurs avantages inhérents aux microorganismes permettent d'expliquer ce nouvel attrait. Facilité de culture, utilisation en tant « qu'usines cellulaires » pour produire des métabolites, possibilité de modifier génétiquement afin d'augmenter la production d'un métabolite particulier, etc. [53]. Aussi, la biomasse microbienne peut être cultivée dans des réacteurs clos contrôlés (composition du milieu, température, pH, etc.), permettant, à l'échelle industrielle, une production durable de métabolites naturels tout au long de l'année, sans contraintes de saisonnalité ou d'aléas climatiques. Ces biomasses microbiennes, ainsi produites, pourront être utilisées dans différents bioprocédés (secteur agroalimentaire, agronomique, production d'énergie ou dépollution, etc.). L'un d'entre eux, nommé induction (ou stress) métabolique, permet d'induire la production spécifique de métabolites secondaires microbiens d'intérêt (molécules produites par un organisme en réponse à un stress), en cultivant la biomasse dans des conditions spécifiques, générant ainsi un stress environnemental [10–13]. Ce bioprocédé peut également permettre d'obtenir des métabolites secondaires d'intérêt présents dans le règne végétal, tout en s'affranchissant des contraintes inhérentes à celle-ci, détaillées en début de ce paragraphe [14]. Ces productions de biomasses microbiennes et de métabolites microbiens peuvent donc être valorisées dans de nombreux domaines (nutraceutique, agroalimentaire, pharmaceutique, etc.) tout en répondant aux différents enjeux sociétaux émergents (naturalité, durabilité, préservation des ressources, etc.).

## **1.2. Sélection des microorganismes pour la recherche de métabolites d'intérêt**

Il est estimé qu'il existe plus de 1 trillion de microorganismes au sein de la bioressource microbienne, c'est pourquoi il est nécessaire de cibler efficacement les microorganismes à étudier [23]. Pour découvrir de nouveaux métabolites microbiens possédant un effet bénéfique sur la santé, il paraît logique de s'orienter sur les microorganismes non pathogènes, c'est-à-dire n'étant pas responsables de l'apparition d'affection chez l'Homme ou chez d'autres êtres vivants [54]. Afin de réduire encore le nombre de microorganismes à étudier, il semble judicieux

de se focaliser sur les microorganismes issus du domaine alimentaire, qui sont régulièrement consommés par l'Homme à travers le monde sans présenter de risques pour la santé (et dont certains peuvent être identifiés comme « GRAS » (Generally Recognized As Safe)) [55]. Ces microorganismes se retrouvent essentiellement dans les aliments et boissons fermentés, qui occupent une place importante dans notre alimentation (environ un tiers des aliments consommés dans le monde sont issus de fermentations) [24,25]. Par conséquent, les aliments issus de fermentations peuvent être assimilés à des sources de microorganismes et/ou de métabolites microbiens potentiellement intéressants car éventuellement dotés de propriétés biologiques d'intérêt.

## **2. Les aliments fermentés**

### **2.1. Définition**

Les aliments fermentés sont définis comme des aliments issus de fermentations, donc produits au moyen d'une croissance microbienne souhaitée et de conversions enzymatiques [56,57]. Au cours du processus de fermentation, les microorganismes vont produire différents types de composés (peptides, acides organiques, alcools, métabolites secondaires, etc.) à partir de substrats présents dans le milieu à fermenter (sucres, acides aminés, etc.) [26]. Historiquement la fermentation était utilisée par l'homme pour conserver des denrées (viandes, poissons, fruits, légumes) [57,58]. Par la suite, ce procédé fut également employé pour sa capacité à améliorer ou développer des qualités organoleptiques de certains aliments (production d'alcool, diminution d'amertume, etc.) [26]. Aujourd'hui, les aliments fermentés occupent une place importante dans l'alimentation à travers le monde (Tableau 1), et l'engouement pour ces aliments est en augmentation depuis quelques années (recherche de produits plus naturels, de nouvelles expériences sensorielles, d'effets bénéfiques sur la santé, etc.) [59]. Le marché des produits et ingrédients fermentés dans le monde est en constante progression, et devrait passer de 637 à 889 milliards de dollars entre 2016 et 2023 d'après une étude du BIS Research, soit une hausse annuelle moyenne d'environ 5 % [59]. La demande accrue pour des denrées alimentaires, pour lesquelles la fermentation joue un rôle important, a conduit à étudier ce processus ainsi que les microorganismes impliqués afin de maîtriser cette fermentation.

*Tableau 1: Consommation moyenne annuelle par habitants de 8 aliments fermentés dans plusieurs pays du monde*

<b>Aliment fermenté</b>	<b>Pays</b>	<b>Consommation moyenne annuelle (par habitant)</b>
Bière	Allemagne	106 L
Fromage	Royaume-Uni	10 kg
Kimchi	Corée	22 kg
Miso	Japon	7 kg
Sauce Soja	Japon	10 L
Tempe	Indonésie	18 kg
Vin	Italie, Portugal,	90 L
	Argentine,	70 L
	Finlande	40 L
Yaourt	Pays-Bas	25 L

*(Tableau traduit de Chilton et al, [60])*

Il existe différents types de fermentation (lactique, alcoolique, propionique, etc.) qui vont varier en fonction des produits obtenus (acide lactique, éthanol, acide propionique, gaz carbonique, etc.). Des recherches ont montré que le type de fermentation était directement lié au type de microorganisme(s) impliqué(s) dans le processus (bactéries lactiques, levures, bactéries propioniques, etc.) [61]. Parmi les différents métabolites produits au cours de ces fermentations, il est envisageable que certains d'entre eux puissent présenter des activités biologiques intéressantes qui puissent être valorisées au travers d'applications en santé.

## **2.2. Des aliments fermentés devenus des aliments santé**

Aujourd'hui, le lien entre la nutrition et la santé est reconnu par le monde scientifique et les instances gouvernementales [62]. L'information auprès du grand public sur l'équilibre nutritionnel impacte les habitudes alimentaires d'une partie de la population, qui tend à adopter une alimentation plus variée, plus saine et plus équilibrée [63]. Cela a entraîné un regain d'intérêt pour certains aliments, et notamment les aliments fermentés. D'autres raisons sont également à l'origine de cet engouement : la recherche de nouvelles expériences sensorielles, de produits moins transformés industriellement, à l'aspect artisanal ou encore les notions d'aliments fonctionnels et de probiotiques, notamment du fait de la présence de microorganismes et de leurs métabolites qui peuvent présenter des activités biologiques intéressantes ([Annexe 1](#)), permettant d'agir bénéfiquement sur l'organisme [59]. Des études

suggèrent que certains aliments fermentés présentent des effets bénéfiques sur la santé et sur certaines maladies : prévention de certains cancers et de l'obésité (Kimchi), diminution du risque cardiovasculaire (produits laitiers fermentés, pain), etc. [25,26,57,60,64–67]. Ces études mettent en avant l'existence d'un lien entre les microorganismes de l'aliment, leurs métabolites et le microbiote intestinal qui seraient à l'origine des effets bénéfiques observés. L'étude des aliments fermentés est cependant loin d'être terminée et de nombreuses fonctionnalités et métabolites restent certainement à découvrir. Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à un aliment fermenté en particulier : le fromage, qui sera présenté plus en détails dans le prochain chapitre.

## Chapitre 3.

### Un aliment fermenté particulier : le fromage

Le terme « fromage » désigne une catégorie de produits alimentaires à base de lait fermenté, possédant une grande variété de saveurs et de formes à travers le monde [68]. Cet aliment est principalement obtenu à partir de lait de vache, chèvre, brebis ou bufflonne, et occasionnellement de chamelle, renne ou autres ruminants. Les premières références historiques faisant mention du fromage remontent au Néolithique (7000 ans av-JC), mais son origine pourrait être encore plus ancienne [69]. Sa production se serait développée en parallèle de l'agriculture et de l'élevage des ruminants. Son origine géographique reste, elle aussi, encore incertaine, bien que des éléments aient permis de mettre en évidence la présence de fromage dans plusieurs parties du monde (Europe tempérée, Égypte, etc.) [70–72]. Au fil des siècles le fromage a réussi à s'imposer dans notre alimentation et notre mode de vie, comme le montrent les chiffres de la production mondiale : environ 22 millions de tonnes de fromages produits dans le monde en 2017 [73]. La fabrication de ce produit est un savoir-faire, faisant partie de la culture propre à chaque pays. En France, sur plus de 1000 fromages répertoriés, 45 ont par ailleurs reçu l'Appellation d'Origine Protégée (AOP), qui vise à protéger et à valoriser un produit dont toutes les étapes de production sont réalisées selon un savoir-faire, dans une aire géographique définie (également appelée terroir) [74–76]. Cette appellation atteste que les qualités organoleptiques sont essentiellement, ou exclusivement liées au terroir dans lequel l'aliment est obtenu [77]. Celle-ci est reconnue comme un gage de confiance par le consommateur à la recherche de produits locaux, plus respectueux des traditions (savoir-faire de fabrication, développement durable, etc.) [78,79].

Néanmoins le fromage a souvent été critiqué. Il peut être perçu par certains comme mauvais pour la santé car considéré comme trop gras ou trop salé [27,28]. A cela s'ajoute les craintes liées au risque sanitaire qui peut résulter de la contamination du fromage par des microorganismes pathogènes (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, etc.) [29,80]. Il ne faut cependant pas oublier que la biodiversité microbienne du fromage est constituée de microorganismes non pathogènes, dont certains seront indispensables pour l'obtention de l'aliment, notamment en participant au développement de ses propriétés organoleptiques [81]. Les changements survenant dans l'aliment ont lieu sous l'action des microorganismes, action



qui va elle-même dépendre de l'environnement et de la composition chimique du fromage, c'est-à-dire de la variété de métabolites pouvant être transformés par ces microorganismes. Ces deux paramètres (flore microbienne et composition chimique) vont être impactés tout au long du procédé permettant d'obtenir le fromage. C'est la raison pour laquelle il est important de maîtriser l'ensemble des différentes étapes de la fabrication fromagère.

## **1. Du lait au fromage : l'impact des étapes du circuit de fabrication du fromage sur sa composition chimique et sa biodiversité microbienne**

Le fromage est un aliment obtenu à la suite de différentes étapes (Figure 3), au cours desquelles ses propriétés organoleptiques (saveur, flaveur, texture, etc.) vont se développer sous l'action de sa flore microbienne [82–84]. Ce développement dépend de la composition chimique des ingrédients et de la biodiversité microbienne tout au long du procédé de fabrication fromagère. Ces deux paramètres vont être impactés par les différentes étapes de fabrication, qu'elles soient communes à tous les fromages (caillage, affinage, etc.) ou spécifiques d'un type particulier (chauffage pour les pâtes cuites, piquage pour les pâtes persillées, etc.). Il apparaît donc important de maîtriser ces étapes afin de contrôler la fabrication du fromage et la production de métabolites secondaires. La suite de ce chapitre se focalise sur le lait, ainsi que sur les seules étapes de la fabrication fromagère ayant un impact important sur la composition chimique et la biodiversité microbienne du fromage, c'est-à-dire les traitements optionnels visant à éliminer les pathogènes du lait, le caillage, le salage et l'affinage du fromage.

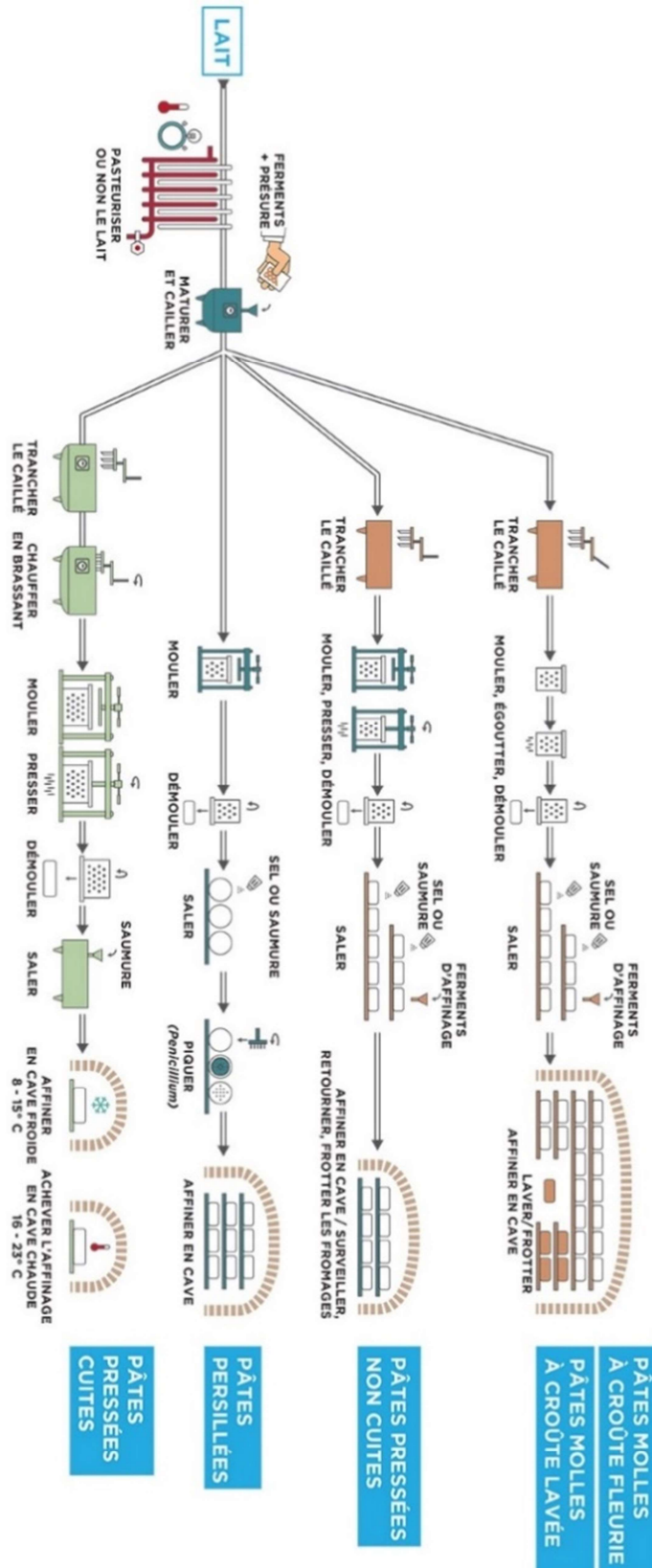


Figure 3 : Circuit de fabrication des différents types de fromage (pâtes molles, pâtes pressées, pâtes persillées, pâtes pressées cuites, etc.)

[85]

## 1.1. Le lait

Depuis le 25 mars 1924, le lait est défini, en France, comme le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée [86]. Sans indication de l'espèce, le mot « lait » désigne le lait de vache. Si le lait provient d'une femelle laitière autre que la vache, la dénomination lait doit être suivie de l'indication de l'espèce animale dont il provient (par exemple : lait de chèvre, lait de brebis, etc.).

### 1.1.1. Composition du lait

Le lait (peu importe l'espèce animale dont il est issu) est un liquide hétérogène blanchâtre, constitué majoritairement d'eau (jusqu'à 90%), et contenant tous les groupes de nutriments : matières grasses ou lipides, glucides (essentiellement le lactose), protéines (caséines essentiellement et protéines hydrosolubles), minéraux et vitamines (Tableau 2) [87].

*Tableau 2 : Composition moyenne de laits couramment utilisés pour la fabrication de fromage (g/L)*

	Eau	Protéines	Dont caséine	Lipides	Lactose	Minéraux
<b>Vache</b>	900	30-35	27-30	35-40	45-50	8-10
<b>Chèvre</b>	900	35-40	30-35	40-45	40-45	8-10
<b>Brebis</b>	860	55-60	45-50	70-75	45-50	10-12
<b>Bufflone</b>	850	45-50	35-40	70-75	45-50	8-10

*(Tableau traduit de Vilain A.-C. [86])*

Ces nutriments vont se répartir dans les différentes phases du lait (Figure 4) [87] :

- La phase aqueuse, contenant les molécules (éléments) hydrosolubles (lactose, protéines et vitamines hydrosolubles, minéraux, etc.).

- Des phases colloïdales instables dans la phase aqueuse (fines particules (micelles) portant chacune une charge électrique de même signe, en suspension dans un milieu) constituées de caséines sous forme de micelles, associées à des minéraux (Phosphate de calcium  $(PO_4)_2Ca_3$ ) (Figure 5) [88].
- Des globules gras en émulsion dans la phase aqueuse, contenant les lipides du lait.

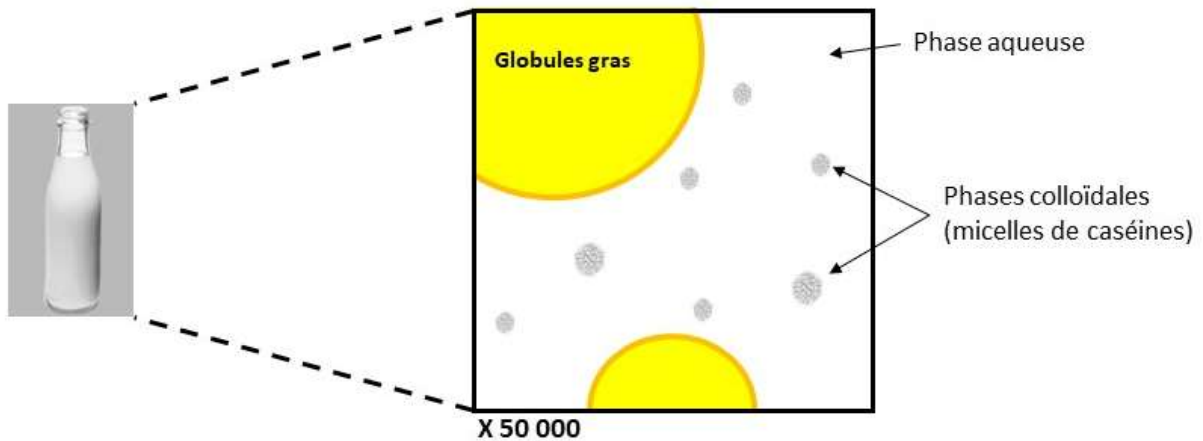


Figure 4 : Les différentes phases du lait

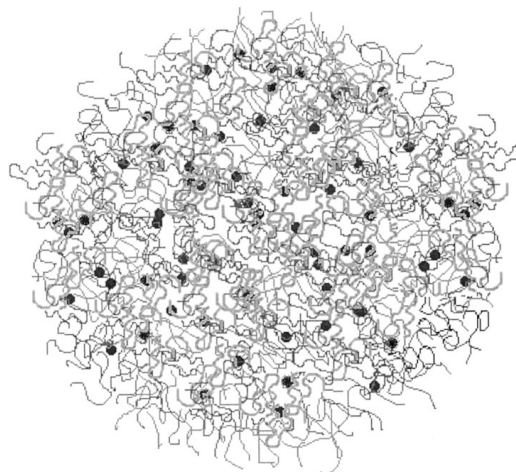


Figure 5 : Structure schématique d'une micelle de caséine du lait.

● : Particules de phosphate de calcium.

Schéma issu de G.C. De Kruif and Holt (2003) [89].

### 1.1.2. Les facteurs influençant la biodiversité microbienne et la composition chimique du lait

La biodiversité microbienne du lait collecté dépend de plusieurs éléments : *i*) l'espèce animale qui peut être à l'origine de différences dans les abondances de souches bactériennes entre les différents laits (Figure 6) [83,90]; *ii*) de nombreux facteurs environnementaux susceptibles d'influencer la flore microbienne du lait : la flore microbienne ambiante de la ferme (lieu d'élevage et lieu de traite) qui peut dépendre des pratiques d'élevage et de l'alimentation (stabulation ou prairie), de sa zone géographique, de la saisonnalité et du climat, des conditions de traite (microorganismes sur la peau des trayons), de la tuyauterie et des appareils de pompage, des cuves de stockage du lait, etc. [91–96]. Ces différents facteurs vont ainsi « définir » la biodiversité microbienne du lait, impactant de ce fait les prochaines étapes du processus de transformation durant lesquelles le lait sera fermenté sous l'action des microorganismes présents et/ou ajoutés.

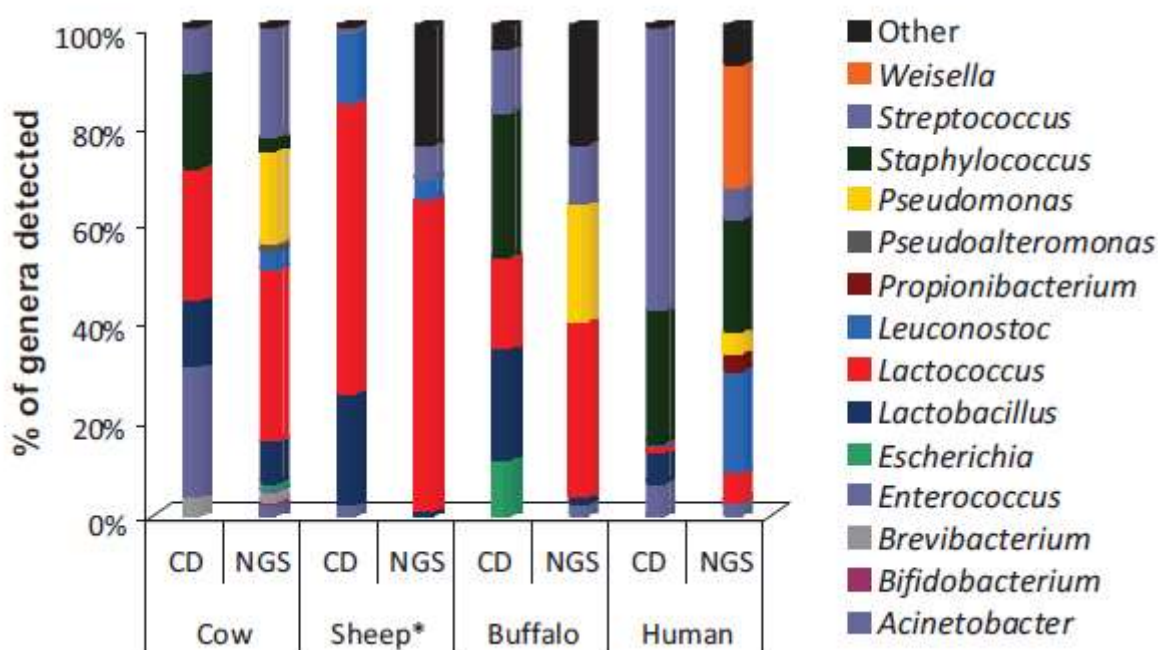


Figure 6 : Abondance relative des bactéries les plus communes détectées dans les laits crus de vache, brebis, bufflonne ou humain.

*Détection réalisée selon une approche de culture-dépendante (CD) ou à l'aide de techniques de séquençage d'ADN nouvelle génération (NGS). Les résultats obtenus par CD représentent un pourcentage par rapport au total des isolats. Les résultats obtenus par NGS représentent un pourcentage par rapport au total de lecture. \* Les données NGS du lait de brebis ont été extrapolées à partir des données relatives aux fromages affinés naturellement fabriqués à partir de lait cru de brebis. [90]*

Cette action des microorganismes est également dépendante de la composition chimique du lait. Comme illustré dans le Tableau 2, cette composition chimique varie en fonction de l'espèce animale dont il est issu [86,97,98]. Les différentes pratiques d'élevage sont également un facteur ayant un impact sur cette composition chimique. Parmi ces pratiques, l'alimentation des animaux va jouer un rôle important, selon qu'ils soient nourris avec du foin (stabulation) ou qu'ils broutent de l'herbe et des plantes fraîches (pâturage). Cette alimentation est également dépendante de la localisation géographique de l'élevage (régions, altitude, etc.) [99,100]. Tous ces facteurs auront un impact direct sur la composition chimique du lait, influençant alors ses propriétés organoleptiques et sa « fromageabilité », mais également celles des futurs fromages [101–109].

## 1.2. Les principaux traitements utilisés pour réduire la flore microbienne du lait

Une fois collecté, le lait peut subir ou non (cas du lait cru) des traitements visant à éliminer les microorganismes pathogènes, pouvant être à l'origine de risques sanitaires. Les principaux traitements utilisés sont les suivants (Figure 7) :

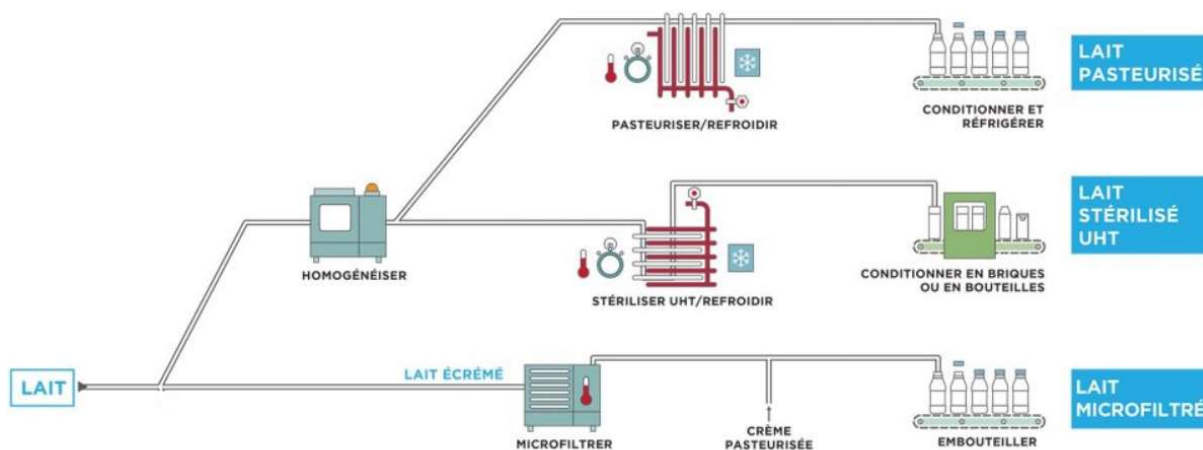


Figure 7 : Les différentes méthodes de traitement pour réduire la flore microbienne du lait.

[110]

- La pasteurisation : elle consiste à chauffer le lait pendant 15-20 secondes à une température comprise en 72 °C et 85 °C, puis immédiatement refroidi et maintenu à moins de 6 °C pour conservation. Le lait obtenu est dénommé « lait pasteurisé », et se conserve

environ une semaine. Ce procédé permet de diminuer fortement la biodiversité microbienne du lait et de conserver un goût et une valeur nutritive proche du lait cru [111–113].

- La stérilisation thermique : ce procédé consiste à chauffer le lait à haute température pour éliminer les pathogènes tout en permettant une meilleure conservation. Deux conditions existent : 115 °C pendant 15 à 20 minutes (on parle alors de « lait stérilisé »), entre 140 °C et 150 °C pendant 1 à 5 secondes — ce qui conduit au « lait UHT » (ultra haute température) dont les qualités gustatives sont mieux préservées que le « lait stérilisé » [111,113].
- La stérilisation par microfiltration : tout comme le lait cru, le lait microfiltré ne subit pas de traitements thermiques. Ce procédé consiste à filtrer le lait « écrémé » (dont la crème a été retirée au préalable) au travers d'une membrane dont les pores sont de l'ordre du micromètre. Cela permet d'éliminer les microorganismes (dont les pathogènes ciblés) sans chauffer, et sans retenir (sur le filtre) les molécules contenues dans le lait, préservant ainsi ses saveurs et ses qualités nutritionnelles. On rajoute ensuite la crème qui aura été préalablement pasteurisée pour obtenir le pourcentage de matière grasse souhaitée. Cette stérilisation est la plus efficace pour éliminer les microorganismes tout en préservant les saveurs [111,112].

Bien que ces traitements soient réalisés pour éliminer les pathogènes, ils ne sont pas sélectifs et impactent tous les types de microorganismes présents dans le lait. De ce fait, les populations microbiennes (pathogènes ou non pathogènes) des laits traités seront diminuées comparativement au lait cru (qui possède par conséquent la plus riche biodiversité microbienne) [112,113], entraînant une variation dans la population microbienne des futurs fromages issus de ces laits [112,114,115]. Or parmi ces microorganismes certains devraient participer aux différentes étapes de fermentation, durant lesquelles la composition chimique va évoluer *via* la production de métabolites secondaires microbiens et de réactions biochimiques (hydrolyse, lipolyse, etc.). Cette évolution de la composition chimique va conduire, entre autres, à un développement des propriétés organoleptiques des fromages. Ainsi, cette différence de population microbienne permet notamment d'expliquer la majeure partie des différences organoleptiques identifiées entre les fromages issus du lait cru de ceux issus de lait pasteurisé [116–118].

### 1.3. Le caillage du lait

Le caillage du lait (également appelé coagulation) est défini comme étant la déstabilisation des micelles de caséines [119], causant ainsi leur agrégation pour former un gel lactique composé de deux phases : le caillé (phase solide) et le lactosérum, également dénommé petit-lait (liquide jaune-verdâtre, composé principalement d'eau, de lactose, de sels minéraux solubles et de protéines solubles). La coagulation correspond à la première étape au cours de laquelle il peut y avoir une fermentation. La coagulation peut être provoquée par acidification due à l'action de bactéries lactiques ou sous l'action d'un enzyme (utilisation de présure) ou par combinaison de ces deux actions :

- L'acidification du lait se fait notamment par fermentation grâce à l'ajout de ferments lactiques (microorganismes) (on parle alors de coagulation acide ou par voie fermentaire). Le lactose est métabolisé en acide lactique sous l'action des bactéries lactiques, provoquant une chute du pH. Cette diminution de pH entraîne une perte de la charge électrique des caséines. Lorsque leur point isoélectrique ( $\text{pH} = 4,6$ ) est atteint, la répulsion électrostatique entre les micelles disparaît, ce qui cause leur coagulation (Figure 8) [119]. La baisse de pH a également pour effet d'augmenter la solubilité des minéraux (phosphate de calcium) dans la phase aqueuse, déstabilisant davantage les micelles. Le gel lactique ainsi obtenu sera friable, non contractile et perméable [120]. Les bactéries couramment utilisées dans les processus fromagers sont les genres *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* et *Streptococcus* [121].



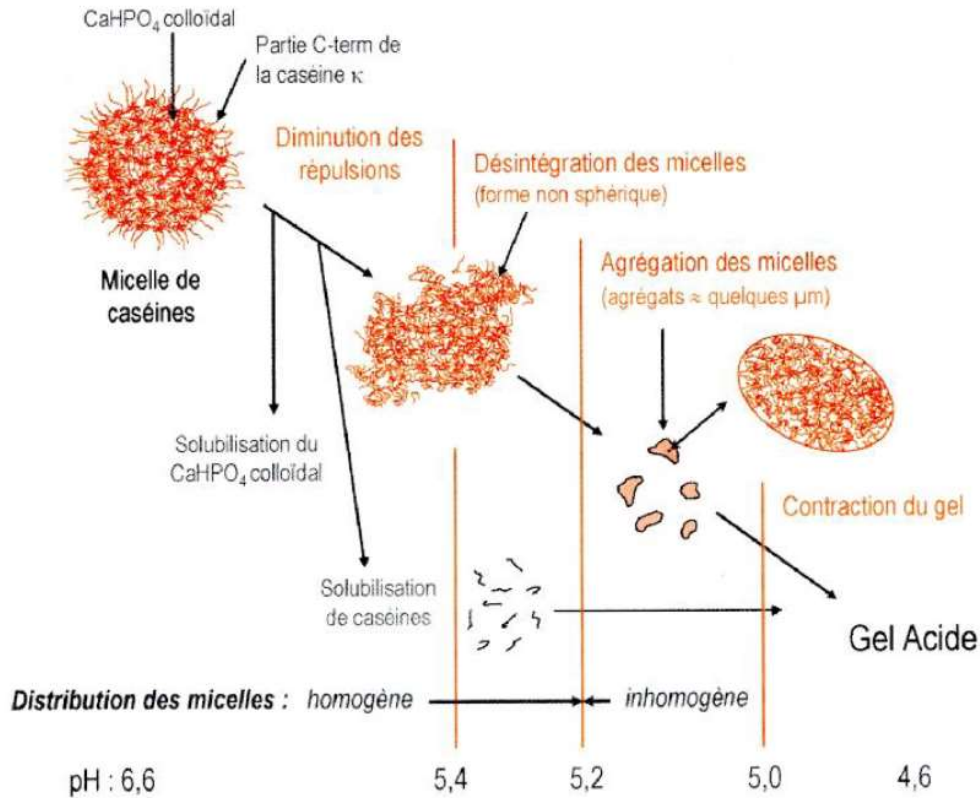


Figure 8 : Schématisation du processus intervenant lors de la coagulation acide des caséines du lait [122].

- La coagulation enzymatique se produit en présence de présure : mélange d'enzymes (chymosine et pepsine), provenant de caillettes de jeunes ruminants abattus avant sevrage. Dans les conditions optimales (température entre 40 °C et 42 °C ; pH = 5,5), la présure déstabilise les micelles de caséine et provoque ainsi leur coagulation (Figure 9) [119]. Le gel obtenu aura comme caractéristiques : d'être élastique, contractile et imperméable [120].

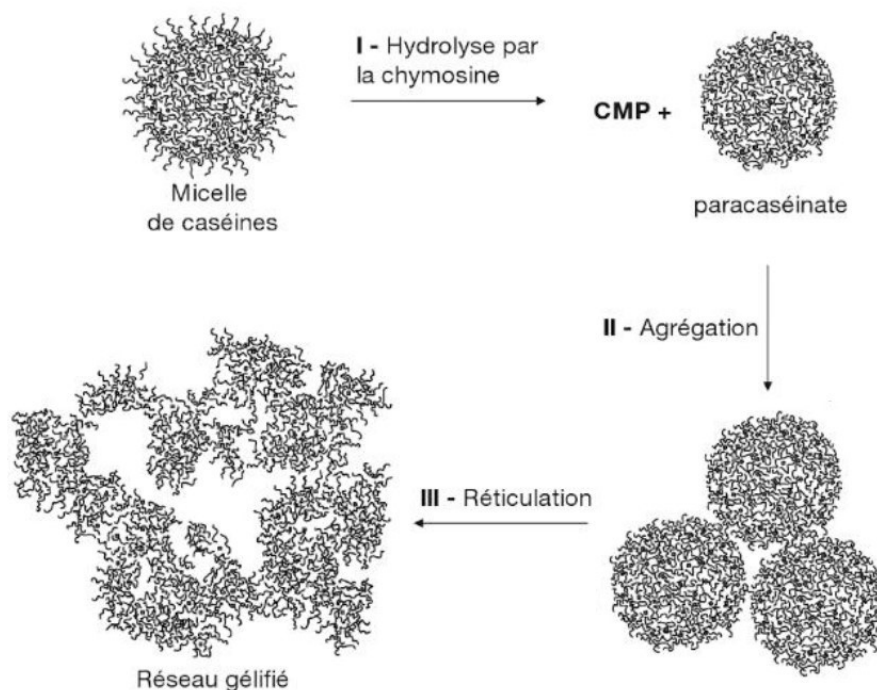


Figure 9 : Schématisation du processus intervenant au cours de la coagulation enzymatique des caséines du lait.

*CMP : caséinomacropéptide, partie hydrophile de la micelle, libérée suite à l'action de l'enzyme. Schéma adapté de Isabelle Fournier (2019) [123].*

- La coagulation mixte qui consiste en une action conjuguée de la présure et de l'acidification (par les microorganismes) du milieu, avec, en général, la prédominance de l'une des deux actions. Ce procédé de coagulation est employé pour la majorité des fromages.

Après coagulation, le gel lactique est séparé du lactosérum qui est souvent éliminé. Le caillé résultant est ensuite moulé puis égoutté afin d'éliminer le lactosérum résiduel. Au cours de l'étape de caillage, la flore microbienne évolue (différence entre la flore du lait utilisé et celle du caillé obtenu) et ceci en fonction du type de coagulation mis en œuvre : des ferments sont ajoutés lors de la voie fermentaire et lors de la coagulation mixte, impactant de fait la diversité microbienne [95,124]. La composition chimique va, elle aussi être modifiée lors de la coagulation. Des substrats vont être consommés et de nouveaux métabolites vont être produits sous l'action des microorganismes (par exemple, de l'acide lactique à partir de lactose). Par ailleurs, certains de ces nouveaux métabolites (par exemple des peptides) peuvent être hydrosolubles, et se retrouvent donc dans le lactosérum qui sera éliminé, ne participant plus à la composition du fromage.

### 1.4. L'étape de salage

Après égouttage, le caillé est salé selon l'une des trois méthodes existantes [125] : *i*) le salage à sec qui consiste à ajouter directement des cristaux de sel NaCl dans le caillé tranché ou broyé avant de mélanger l'ensemble et de le mouler ; *ii*) le salage à sec de surface qui consiste à frotter la surface du caillé moulé avec du sel sec ; *iii*) le saumurage, lors duquel le caillé moulé est immergé dans un bain de saumure.

Les raisons de cette étape de salage sont multiples : exhausser le goût, influencer la texture et la teneur en eau, participer à la conservation, etc. (Figure 10). L'ajout de sel modifie donc les propriétés physico-chimiques du fromage (pH, humidité, taux de sodium, etc.), le rendant moins propice pour le développement et le métabolisme de certains microorganismes. Cela permet ainsi de contrôler et de réguler la population microbienne au sein de l'aliment [126] et en particulier d'empêcher le développement de microorganismes indésirables (notamment des flores microbiennes d'altération ou pathogènes).

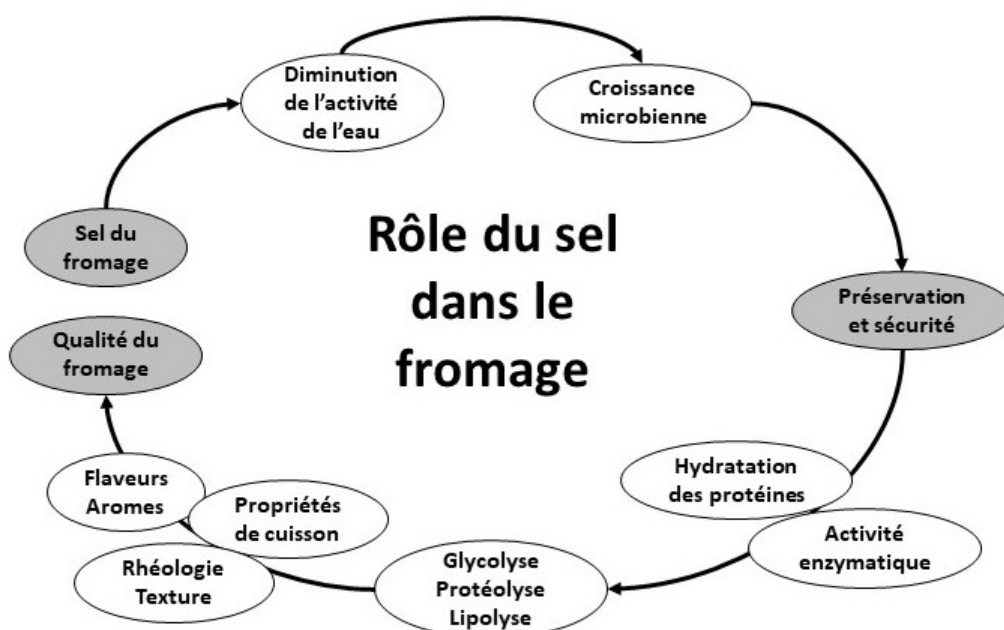


Figure 10 : Les différents rôles du sel dans le fromage.

Schéma traduit de Guinee (2004) [125].

A l'issue de cette étape, et avant de réaliser l'affinage, on obtient un fromage dit « blanc » qui peut être consommé tel quel (exemple : feta, mozzarella, etc.) ou affiné.

### 1.5. L'affinage du fromage

Au cours de cette étape se produit une seconde fermentation au cours de laquelle le fromage développe ses saveurs et acquiert sa texture définitive. Il s'agit d'une étape complexe, demandant de maîtriser et de contrôler de nombreux paramètres environnementaux, faisant partie d'un savoir-faire : température, humidité, supports sur lesquels les fromages vont être affinés (par exemple la paille), ferments d'affinage ajoutés par le fromager, flore microbienne de la cave (pouvant agir comme ferment d'affinage), etc. L'étape d'affinage peut durer de quelques jours à plusieurs semaines voire plusieurs mois ou années selon la variété de fromage. Certains fromages, comme le Cantal, peuvent être consommés à différents stades d'affinage (Cantal jeune, 1 à 2 mois d'affinage ; Cantal entre-deux, 3 à 7 mois ; Cantal vieux, au moins 8 mois d'affinage) [127].

De nombreux changements interviennent au cours de cette étape, que ce soit au niveau de la composition chimique du fromage, des paramètres physico-chimiques (pH, viscosité, etc.) ou encore de la biodiversité microbienne [101,105,112,128–130]. Afin de s'adapter aux nouvelles conditions de leur environnement ou du fait de l'existence d'une compétition entre eux, les microorganismes consomment différents substrats de la matrice fromagère (résidu de lactose, lactate, citrate, lipides, protéines, etc.) et produisent de nouveaux métabolites (acides aminés, peptides, acides gras, oligosaccharides, etc.), dont la plupart vont participer au développement des qualités organoleptiques [131,132]. Par conséquent, cette action va dépendre de la composition chimique et de la flore microbienne présente dans le fromage au cours de l'étape d'affinage. D'autres facteurs, parfois spécifiques à une variété de fromage, peuvent également modifier la flore microbienne avant ou pendant l'affinage : développement de certains microorganismes (tel que *Penicillium roqueforti*) suite à une étape de piquage pour les pâtes persillées (ajout de ferments d'affinage par le fromager), présence de microorganismes propres de la cave d'affinage, etc.

Les différentes étapes que nous venons de décrire sont celles ayant un impact important sur la composition chimique et la biodiversité microbienne du fromage, et donc sur le développement de ses propriétés organoleptiques. Elles ont aussi un impact d'autant plus important lorsque le fromage est étudié pour les effets bénéfiques sur la santé que peuvent procurer ses microorganismes et leurs métabolites.

## **2. Le fromage comme source de microorganismes et de métabolites à effet santé**

Le fromage est souvent considéré comme un aliment de plaisir par le consommateur mais il souffre parfois d'une mauvaise image nutritionnelle [133,134]. Cependant, cette vision du fromage est actuellement en train d'évoluer, celui-ci étant de plus en plus inclus dans des régimes alimentaires en tant que source de nutriments essentiels (lipides, protéines, vitamines, minéraux, etc.) [133]. Ainsi, au même titre que les autres aliments fermentés, il est possible de constater un regain d'intérêt pour le fromage, provoqué par les changements dans les habitudes alimentaires adoptés par une partie de la population à la recherche d'une alimentation plus saine et équilibrée (comme décrit dans le chapitre 2 de cette partie). Le fromage pourrait également profiter de la notion d'aliment fonctionnel, du fait de la présence de microorganismes pouvant agir bénéfiquement sur la santé. En effet, il est envisageable que parmi les métabolites que produisent les microorganismes, certains possèdent des activités biologiques bénéfiques sur la santé. De nombreuses bactéries retrouvées dans le fromage ont d'ailleurs présenté, lorsqu'étudiées de manière isolées lors d'études *in vitro* et/ou *in vivo*, des effets bénéfiques sur des processus biologiques (inflammation, stress oxydatif) qui nous intéressent au cours de cette thèse [7,8,141,30,31,135–140]. Ces effets bénéfiques sont observables du fait de la présence de ces bactéries, ou par l'action des métabolites secondaires produits par ces mêmes bactéries. Cependant, ces études ont été réalisées à partir de microorganismes isolés, mais très peu de recherches sont menées concernant leurs effets sur la santé lorsqu'ils sont présents dans la matrice alimentaire. Par conséquent, le potentiel d'investigation associé aux effets sur la santé du fromage, de ses microorganismes et de leurs métabolites reste important. C'est dans ce contexte que nos travaux de thèse s'intéressent aux fonctionnalités des flores microbiennes du fromage, et plus particulièrement du fromage au lait cru. En effet, sa riche biodiversité microbienne permet de l'assimiler à un bioréacteur dans lequel les microorganismes vont produire des métabolites secondaires, dont certains peuvent être responsables d'effets bénéfiques sur la santé du consommateur. L'étude de cet aliment a nécessité le développement d'une stratégie preuve de concept, dont les étapes seront détaillées dans le chapitre suivant.

## Chapitre 4.

# Développement d'une stratégie pour la recherche et l'étude de métabolites bioactifs dans le fromage

La recherche et l'étude de métabolites bioactifs dans une ressource naturelle nécessite de définir clairement le processus biologique ciblé. Dans le cadre de cette thèse nous avons choisi de nous intéresser au vieillissement. En effet, depuis plusieurs années nous assistons à un allongement de la durée de vie de la population, entraînant une augmentation du nombre de personnes âgées de plus de 60 ans dans le monde (de 205 millions en 1950 à environ 810 millions en 2012) (Figure 11). Cependant, cette population ne vieillit pas forcément en bonne santé et est sujette à diverses affections, pouvant être couplées à une perte d'autonomie et donc entraîner une problématique de dépendance (Figure 12) [18,19]. Pour répondre à cette problématique, le secteur de la santé s'intéresse aux différents processus biologiques qui interviennent au cours du vieillissement (notamment inflammation, stress oxydatif, senescence, etc.) [21,22]. Deux processus nous intéressent particulièrement au cours de cette thèse : les processus inflammatoire et oxydatif. Nos travaux consistent à rechercher de nouveaux métabolites actifs contre le vieillissement, en agissant notamment sur ces processus biologiques.

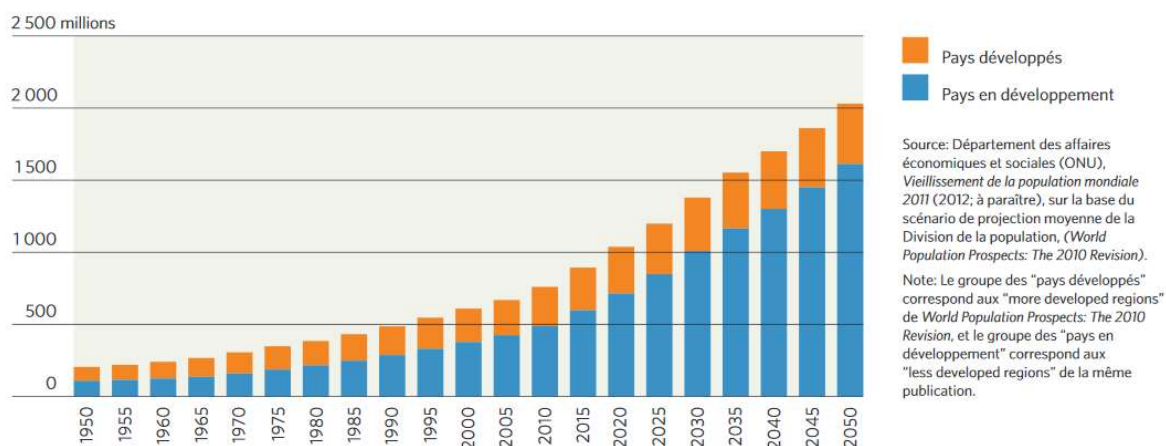


Figure 11 : Evolution du nombre de personnes âgées de plus de 60 ans dans le monde entre 1950 et 2050

[16]

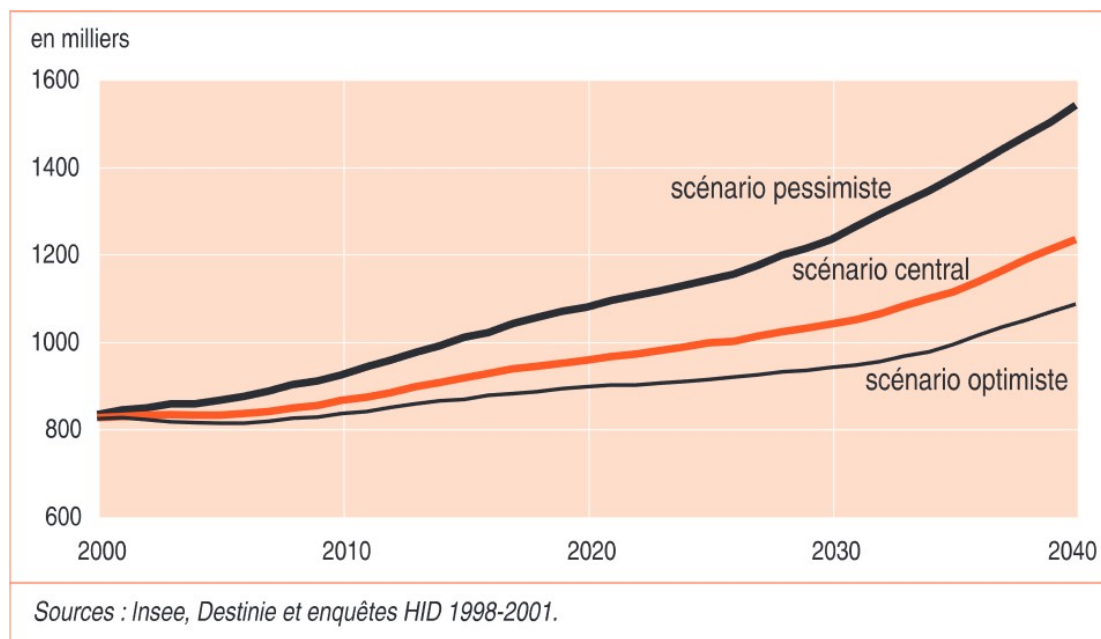


Figure 12 : Evolution du nombre de personnes âgées dépendantes en France  
[142]

La recherche et l'étude de ces métabolites nécessitent le développement et la validation d'une stratégie applicable à n'importe quel type de fromage, mais également aux aliments fermentés, voire à l'ensemble des aliments. Afin de réaliser cela, cette stratégie peut s'appuyer sur l'une des deux démarches de recherche et d'isolement de substances naturelles décrites dans le chapitre 1 : le chimioguidage ou le bioguidage. Dans le cadre de cette thèse, nous avons décidé de rechercher des métabolites bioactifs qui présentent un effet bénéfique sur la longévité et les processus inflammatoires et oxydatifs impliqués lors du vieillissement. Afin de ne pas perdre d'informations et risquer d'écarter des métabolites potentiellement intéressants, nous avons choisi d'exclure la recherche d'une famille de molécule spécifique, et ainsi de privilégier une approche par bioguidage. Le développement de la stratégie va donc se dérouler en quatre étapes : **i)** la sélection du ou des modèles d'étude (fromage) ; **ii)** l'isolement des métabolites de la matrice fromagère, *via* la réalisation d'extraits ; **iii)** l'évaluation de l'activité biologique de ces extraits, à l'aide d'un ou de plusieurs modèles d'étude *in vitro* ou *in vivo*, permettant également de réaliser une étude mécanistique ; **iv)** l'analyse de la composition chimique des extraits ayant présenté des effets positifs lors des tests précédents.

La mise au point de ces étapes a nécessité de faire des choix afin de développer une méthodologie efficace. Celle-ci sera présentée dans la suite de ce chapitre.

## **1. Sélection du modèle d'étude et des conditions d'extractions des métabolites**

### **1.1. Sélection du fromage à étudier**

Il existe un très grand nombre de fromages dans le monde, et en particulier en France, où plus de 1000 types sont recensés [143]. Dans le cadre de nos recherches, nous avons choisi de travailler sur un modèle simple pour développer et valider la méthodologie. Ce fromage a été choisi selon les critères suivant :

- **Le type du lait** : concernant l'espèce nous avons décidé de sélectionner le lait de chèvre car peu d'études ont été réalisées sur les fromages issus de ce lait, ce qui laisse envisager un important potentiel d'investigation. Ensuite, afin d'augmenter la probabilité de découvrir de nouveaux métabolites microbiens potentiellement actifs, il est apparu plus judicieux de travailler à partir d'une matrice fromagère riche en microorganismes. Pour cela, nous avons retenu un fromage de chèvre au lait cru pour développer notre étude.
- **La variété de fromage** : étant donné que nous étions dans le cadre d'un développement et de la validation d'une stratégie de recherche de métabolites, nous avons choisi de travailler à partir d'un modèle de fromage considéré comme « simple », un caillé lactique, en comparaison avec d'autres variétés de fromage « plus complexes » (pâte persillée, pâte pressée, etc.).
- **L'origine du fromage (lieu de production, affinage et saison)** : le fromage a été acheté auprès d'un agriculteur/producteur local, permettant une bonne traçabilité de la matière première. Il s'agit donc d'un caillé de chèvre commercial. Celui-ci a été sélectionné à son stade de commercialisation, donc à la période à laquelle il sera le plus souvent consommé, ce qui correspond à une période de 20 jours d'affinage. Enfin, nous avons choisi de ne pas acheter le fromage lors de la période hivernale, car les chèvres sont élevées en stabulation et nourries qu'avec du foin.

### **1.2. Développement et validation de l'étape d'extraction**

Le fromage est une matrice alimentaire de composition complexe, avec, notamment, une part lipidique importante. Comme nous l'avons mentionné précédemment, il est nécessaire d'extraire les métabolites du fromage pour les identifier et caractériser leurs activités. Comme



décrit dans le chapitre 1, la méthode d'extraction s'articule autour de 2 étapes : la préparation de la ressource (séchage et broyage) et la réalisation de l'extraction à l'aide d'un solvant. Concernant la préparation de la ressource, il sera nécessaire de déterminer la manière dont le fromage va être amené au contact du solvant (séchage, broyage, etc.). Dans le cadre de ces travaux, nous avons fait le choix d'extraire toute la partie du fromage qui est habituellement consommée. Dans le cas d'un caillé lactique, la totalité du fromage est consommée et donc l'intégralité de la matière première sera extraite. Ce choix a été retenu car, sans certitude sur la localisation de potentiels métabolites bioactifs dans la matrice, nous voulions favoriser une étude la plus exhaustive possible. Ensuite nous avons fait le choix de le lyophiliser afin d'éliminer l'eau présente dans l'aliment. Deux raisons ont conduit à ce choix : *i*) l'eau de l'aliment est un facteur limitant de l'extraction lors de l'utilisation de solvants organiques ; *ii*) cela permet d'obtenir un solide sec, pouvant être facilement broyé pour augmenter la surface de contact entre la matrice à extraire et les solvants d'extraction.

La deuxième étape consiste à extraire la matière première. Le fromage est un aliment composé de plusieurs familles de molécules de natures très différentes (propriétés physico-chimiques, taille de molécules, etc.). Cependant, nous n'avons que peu de renseignements précis sur les métabolites présents dans le fromage, hormis la présence de lipides et de molécules très polaires (peptides, protéines, etc.). De ce fait, nous avons choisi de recourir à plusieurs solvants, de polarités croissantes, de manière à extraire le maximum de métabolites de la matrice. Les solvants retenus pour cette étude sont le cyclohexane, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle, l'éthanol et l'eau (Figure 13) [144–148]. Ceci va permettre de créer un gradient de polarité, en réalisant des extractions successives avec chaque solvant (Figure 14), et ainsi d'extraire le maximum de métabolites afin de perdre le moins d'informations possible sur la composition du fromage. Le solvant des différents extraits ainsi obtenu sera évaporé, pour revenir à des extraits secs, qui seront ensuite évalués pour déterminer leur activité biologique, ce qui nécessite le développement d'une méthode de crible biologique.

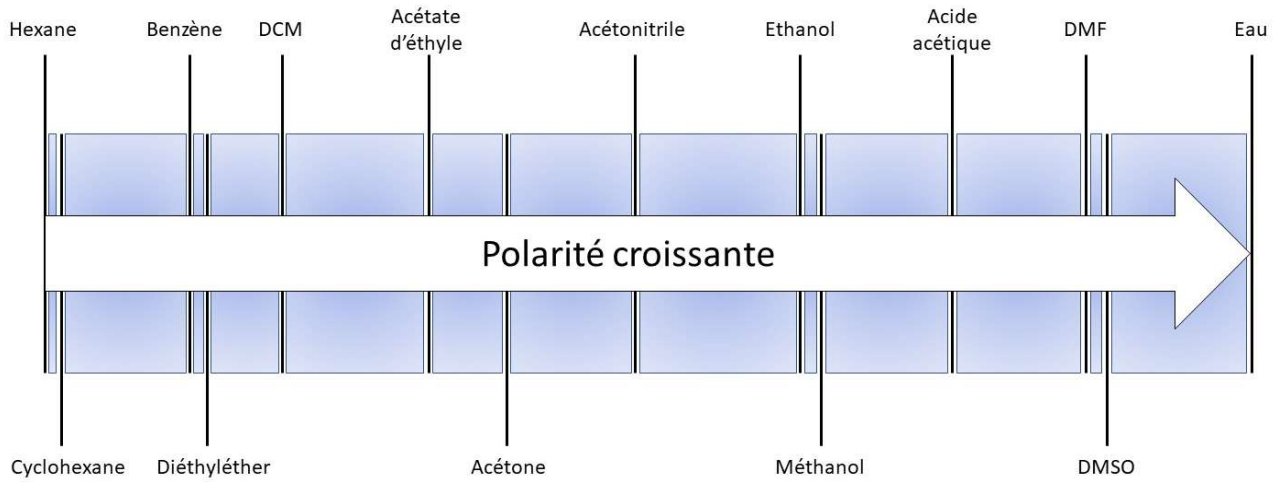


Figure 13 : Classement qualitatif de différents solvants selon leur polarité

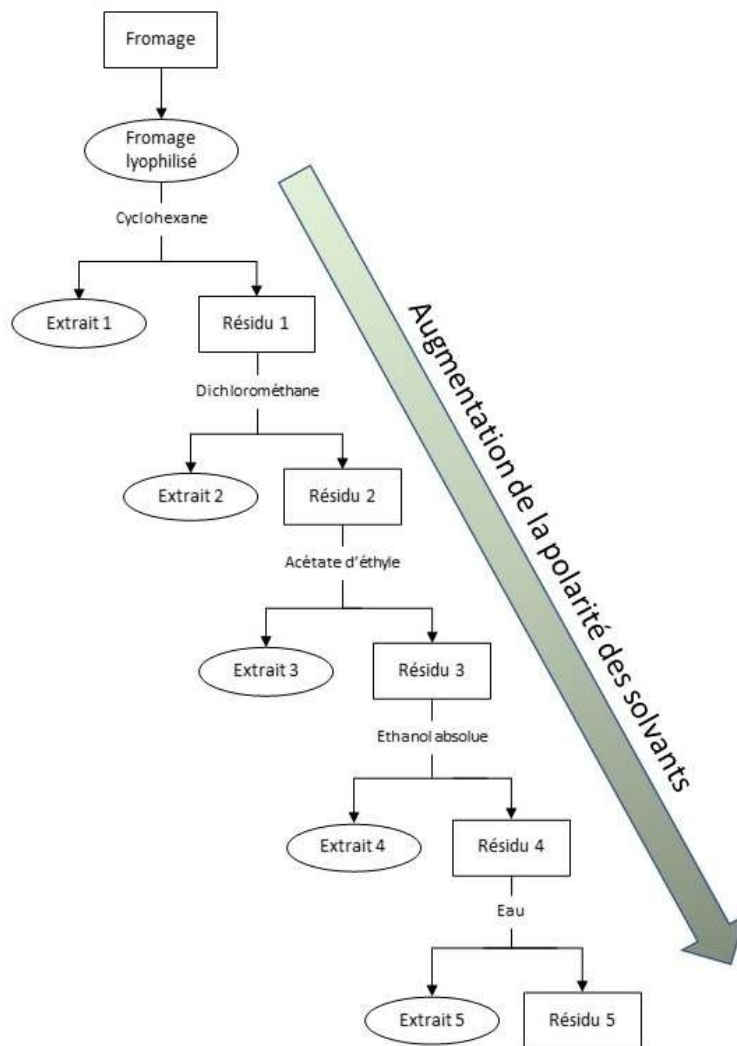


Figure 14 : Schéma de l'extraction fractionnée appliquée au cours de la thèse

## **2. Choix d'un modèle biologique pour l'étude du vieillissement**

Il existe différents modèles biologiques permettant d'étudier le vieillissement et ses différents aspects, que ce soit des modèles *in vitro* [149] ou *in vivo* [150,151]. Afin de sélectionner celui qui serait le plus pertinent pour mettre en évidence l'activité des extraits dans notre étude (criblage), il est important qu'il remplisse les critères suivants : *i*) être adapté à notre problématique, en permettant une évaluation de l'impact des extraits sur le vieillissement d'une manière générale (par exemple, test de longévité) ; *ii*) être reproductible, afin que les résultats obtenus soient fiables ; *iii*) être rapide, afin de cribler l'activité de plusieurs extraits, dans un temps limité. Par ailleurs, il serait intéressant que ce modèle biologique permette également de réaliser des études mécanistiques au niveau moléculaire afin d'approfondir les mécanismes d'action des extraits qui présentent un effet bénéfique. Pour ces différentes raisons, nous avons choisi de recourir au modèle *in vivo* *Caenorhabditis elegans*. Afin de réaliser une corrélation entre les résultats obtenus chez le ver et l'Homme, un second modèle d'étude, les leucocytes humains, a été choisi pour étudier l'impact des extraits sur la production de radicaux libres *in vitro*.

### **2.1. *Caenorhabditis elegans*, un modèle *in vivo* pour l'étude de longévité**

*Caenorhabditis elegans* est un ver bactériovore, mesurant jusqu'à 1 mm de long à l'âge adulte, et appartenant au phylum des *Nematoda* (nématodes) [152]. Cet organisme eucaryote a été décrit pour la première fois en 1900 par le biologiste français Emile Maupas [153,154]. Il fut d'abord identifié sous le nom de *Rhabditis elegans*, avant qu'Osche ne lui donne en 1952 sa dénomination actuelle, *Caenorhabditis elegans* [155]. Ce modèle est cultivable en laboratoire (du fait de sa petite taille et de son type de nourriture), ce qui en a fait un modèle de choix pour les chercheurs. Sydney Brenner fut un des pionniers de son utilisation dans les années 60 en ayant l'idée de l'utiliser comme modèle génétique dans ses études sur le développement [153]. Par la suite, différents avantages présentés par *C. elegans* lui ont valu de s'imposer comme un modèle de référence et utilisé dans de nombreux domaines : neurobiologie, écotoxicologie, interactions hôtes-microorganismes, maladies neuro-dégénératives ou encore étude du vieillissement [45,150,156].

*C. elegans* est un nématode hermaphrodite autofécondant. Cette caractéristique permet de conserver le patrimoine génétique d'une génération à l'autre, et donc les phénotypes liés à une

mutation d'un gène survenu chez une génération. Ses conditions de reproduction pouvant être facilement maîtrisées au laboratoire, cela permet pour un faible coût d'entretien, de conserver plusieurs générations d'individus dans quelques boîtes de pétri [157]. Sa courte durée de vie (environ 15 jours) fait de lui un modèle pertinent pour des études en lien avec le vieillissement. D'un point de vue anatomique il présente l'avantage d'être transparent, permettant de réaliser des observations en microscopie à fluorescence. *C. elegans* possède également une grande homologie avec l'homme, 74 % des protéines humaines ont des homologues chez le ver [158,159]. Plusieurs voies métaboliques du ver sont par ailleurs fortement conservées chez l'Homme comme la voie DAF-2/DAF-16, intervenant dans la modulation de la santé du ver et sa longévité [160]. Parmi les gènes de ces voies, certains ont été identifiés comme participant aux principales voies impliquées dans la sénescence du ver (voies DAF-2/DAF-16, voie p38 MAPK, voie JNK), et qui peuvent tout particulièrement nous intéresser dans le cadre de cette thèse pour des études mécanistiques [155]. Enfin le génome du ver est aujourd'hui entièrement séquencé, ce qui a permis au *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC, Minneapolis, MN, USA) de générer plus de 12000 souches différentes, dont de nombreux mutants, facilitant des recherches mécanistiques [153].

### **2.1.1. Présentation des principales voies impliquées dans la sénescence du ver**

Les voies de signalisation intracellulaires permettent de transmettre une information de la membrane de la cellule — le plus souvent à partir d'un récepteur cellulaire (ou membranaire) — vers le noyau de la cellule au niveau duquel l'expression des gènes va être modulée, en passant par une cascade d'activations protéiques dans le cytoplasme [161]. Ces voies peuvent être impliquées dans de nombreuses fonctions biologiques : prolifération et différenciation cellulaires, apoptose ou mort cellulaire programmée, inflammation, immunité, etc. Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à deux voies en particulier, qui sont impliquées dans la sénescence du ver, mais également dans son immunité : DAF-2/insulin-like receptor et P38 MAPK.

### 2.1.2. La voie DAF-2/Insulin-like receptor (ILR)

La voie DAF-2 (pour *abnormal Dauer formation*) / ILR, également appelée DAF-2/IGF (insulin-like growth factor), est l'une des voies les mieux décrites et est conservée entre le ver et l'Homme Figure 15. Cette voie est impliquée dans la régulation des phénomènes liés au vieillissement chez le nématode ainsi qu'à son immunité [157,162,163]. Lors du fonctionnement de cette voie il est possible de distinguer deux cas de figure : *i*) lorsque le récepteur DAF-2 est activé par un ligand agoniste (qui déclenche une réponse lorsqu'il se fixe sur un récepteur), cela induit une cascade de signalisations ayant pour conséquence la phosphorylation du facteur de transcription DAF-16, empêchant sa translocation du cytoplasme vers le noyau de la cellule, et donc la régulation de l'expression de gènes permettant d'augmenter sa longévité Figure 15A; *ii*) si un ligand antagoniste se fixe sur DAF-2, ou si le gène *daf-2* n'est pas exprimé (mutation ou RNAi), la voie n'est pas activée. DAF-16 n'est pas phosphorylé et peut être transloqué dans le noyau où il va réguler l'expression de gènes de réponse à un stress, augmentant ainsi la longévité du ver Figure 15B [164].

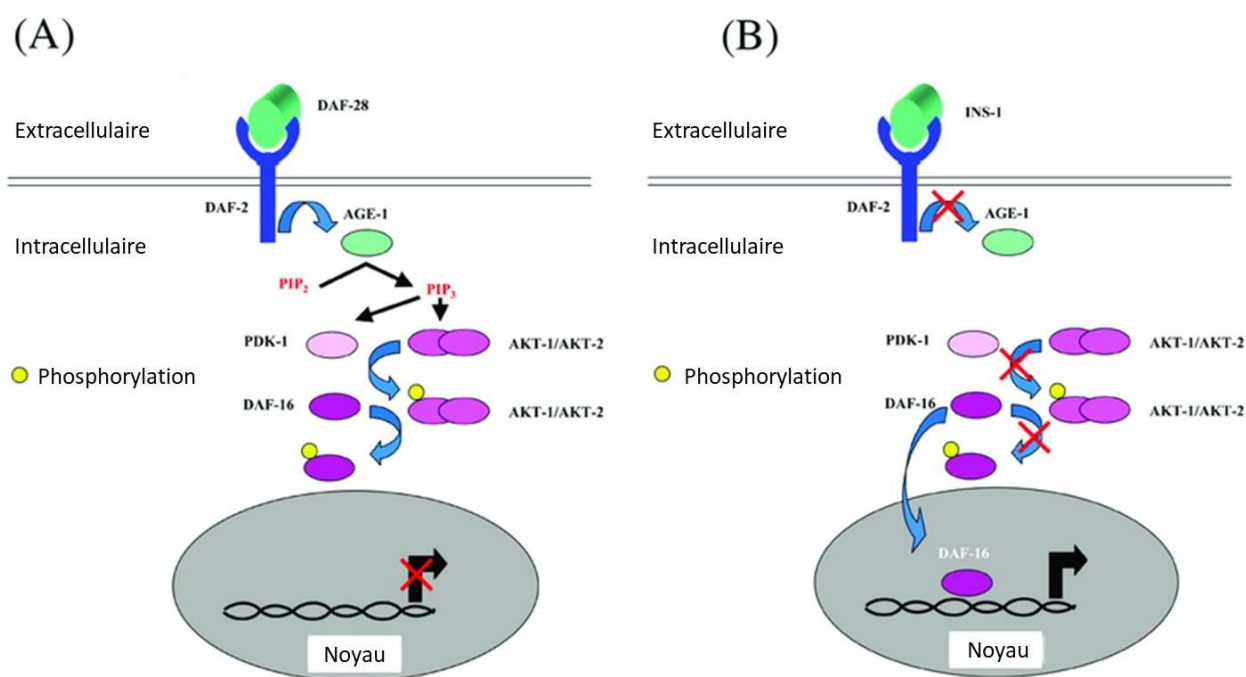


Figure 15 : Voie DAF-2/DAF-16 (voie insulin-like pathway)

(A) un ligand agoniste se fixe sur DAF-2, ce qui provoque une phosphorylation de DAF-16 qui est maintenu dans le cytoplasme ; (B) un ligand antagoniste se fixe sur DAF-2, ce qui empêche la phosphorylation de DAF-16 qui peut se transloquer dans le noyau

(schéma traduit de Ewbank, 2006 [164])

### 2.1.3. p38 MAPK, une voie des Mitogen-Activated Protein Kinase

La voie p38 MAPK appartient aux voies de transduction du signal mitogen-activated protein kinase (MAPK) [165]. Ces voies jouent un rôle clé dans divers processus physiologiques (développement, prolifération, réponse aux stress, immunité, etc.). La voie p38 MAPK est notamment impliquée dans la réponse au stress oxydatif, *via* la synthèse de glutathion (molécule antioxydante intracellulaire) [165]. Elle est conservée entre le ver et l'Homme. Cette voie est également impliquée dans la réponse immunitaire [166] Figure 16. Lorsque le récepteur TOL-1 est activé, cela va déclencher une cascade de signalisations au sein de la voie, qui aura pour conséquence la translocation du facteur de transcription SKN-1 dans le noyau, permettant la régulation de gènes liés à la réponse au stress oxydatif (augmentation de la résistance au stress oxydant).

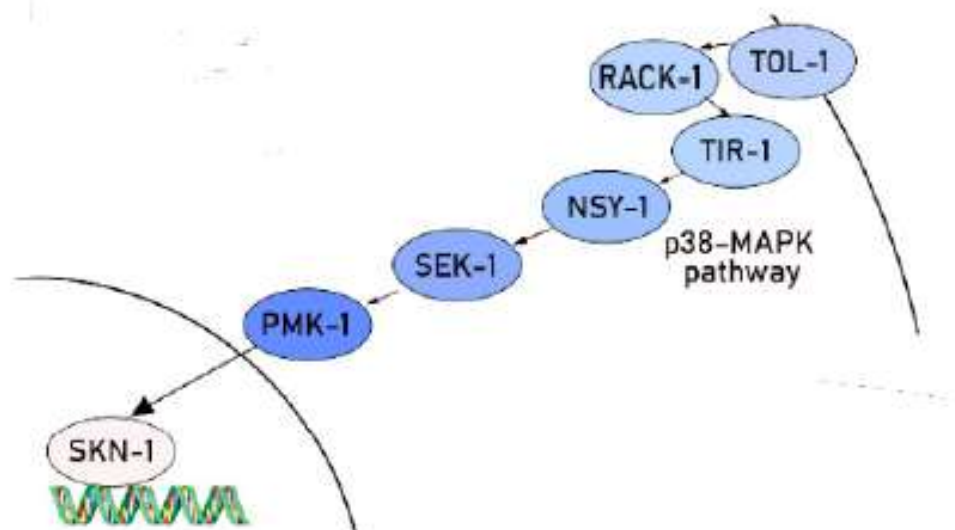


Figure 16 : Voie p38 MAPK  
(schéma issu de Roselli et al, 2019 [163])

### 2.2. Suivi de la production de radicaux libres par des leucocytes humains

Les radicaux libres, également appelés ROS (pour Reactive Oxygen Species en anglais), correspondent à des espèces chimiques dérivées de l'oxygène (anion superoxide, peroxyde d'hydrogène, oxygène singulet, etc.) [167]. Ces espèces vont intervenir au cours du processus

oxydatif qui évolue lors du vieillissement. Les radicaux libres sont susceptibles de causer des dommages aux biomolécules (lipides, protéines, ADN, etc.), conduisant à la mort de la cellule, et à terme, de l'organisme [163]. Afin de réaliser l'étude des extraits de fromage sur le stress oxydant, et de pouvoir effectuer une corrélation entre l'étude sur le ver et l'Homme, nous avons choisi de réaliser une étude *in vitro* permettant d'étudier l'impact des extraits de fromage sur la production de radicaux libres par des leucocytes humains.

### 3. Conclusion

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse consistent à développer une stratégie permettant de rechercher des métabolites bioactifs dans le fromage. Cette stratégie s'applique dans le cadre d'une démarche bioguidée. Au cours de cette thèse, nous nous sommes concentrés sur les quatre premières étapes de la démarche, qui sont résumées en [Figure 17](#) :

1. Choix du modèle d'étude : caillé lactique de chèvre à 20 jours d'affinage.
2. Réalisation d'extraits de fromage : lyophilisation du fromage puis chaîne d'extraction avec du cyclohexane, du dichlorométhane, de l'acétate d'éthyle, de l'éthanol et de l'eau.
3. Réalisation de l'étude biologique : criblage de l'effet des extraits sur le vieillissement et sur le stress oxydant et étude des mécanismes impliqués sur le modèle *C. elegans*. Criblage de l'impact des extraits sur la production de radicaux libres par des cellules humaines.
4. Étude de la composition : Les extraits ayant présenté des effets bénéfiques seront analysés de manière à visualiser leur composition.

Les méthodes mises en œuvre (et validées) dans ce bioguidage ainsi que les différents résultats obtenus sont présentés en détail dans la suite de ce manuscrit.

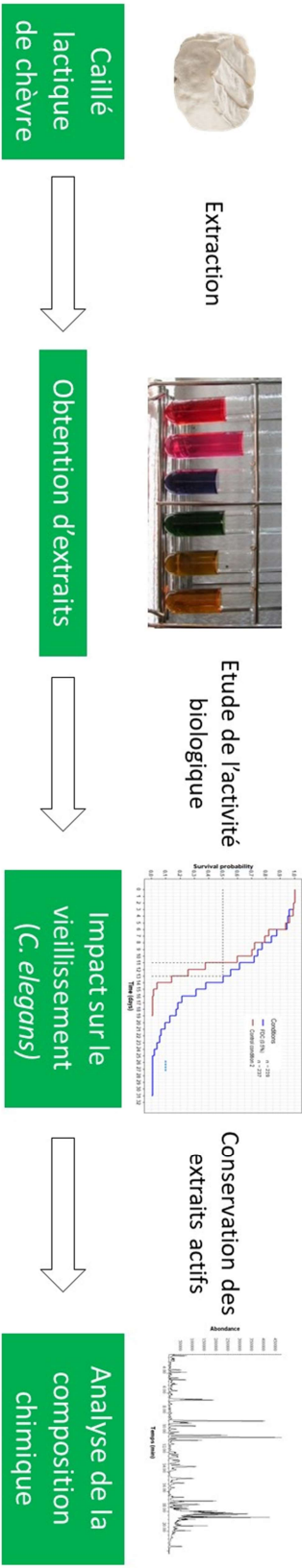


Figure 17 : Schéma du bioguidage réalisé dans le cadre de la thèse





*Deuxième partie :*

*Etude expérimentale*



## **1. Préparation du fromage et du lait de chèvre**

### **1.1. Fromage**

Le fromage a été obtenu auprès de la Chèvrerie des Oliviers (Saint-Georges sur Allier, France) et acheté sous forme de lots. Chaque lot était constitué de 20 à 40 petits fromages de chèvre au lait cru, de type caillé lactique, ayant 20 jours d'affinage. A chaque réception de lot, celui-ci a été séparé en plusieurs aliquots d'environ 300 g, chaque fromage participant à la constitution de chaque aliquot. Ces aliquots ont été conservés à -25 °C jusqu'à l'étape de lyophilisation. L'aliquot décongelé puis écrasé et placé dans plusieurs cristallisoirs, recouvert de parafilm percé, a été introduit dans le lyophilisateur (FreeZone Triad Freeze Dryer, Labconco corporation, Kansas City, Missouri) pendant une nuit. Le solide blanc et sec ainsi obtenu a été broyé à la main au mortier et pilon pour obtenir une poudre, nommé « fromage lyophilisé » (freeze-dried cheese (FDC) en anglais), conservée à 4 °C dans un récipient étanche jusqu'à utilisation.

### **1.2. Cryobroyage du fromage lyophilisé**

Avant utilisation pour les tests sur les vers, le fromage lyophilisé a été cryobroyé (CryoMill, Retsch, Eragny, France) puis conservé à -25 °C dans un récipient étanche jusqu'à utilisation.

### **1.3. Lait de chèvre**

Le lait de chèvre cru a été obtenu auprès de la Chèvrerie des Oliviers (Saint-Georges sur Allier, France). Le contenu des différentes bouteilles a été mélangé, concentré puis lyophilisé (FreeZone Triad Freeze Dryer, Labconco corporation, Kansas City, Missouri). Le solide blanc et sec obtenu a été broyé à la main au mortier et au pilon. Il sera appelé « lait lyophilisé » (freeze-dried milk (FDM) en anglais) et conservé à 4 °C dans un récipient étanche jusqu'à utilisation.

## **2. Extraction du fromage lyophilisé et du lait lyophilisé**

### **2.1. Extraction du fromage**

Le fromage lyophilisé a tout d'abord été extrait au cyclohexane afin d'en retirer les constituants les plus apolaires (le fromage étant connu comme renfermant une fraction lipidique

pouvant atteindre jusqu'à 40 % de sa masse sèche). Ensuite, deux procédés d'extraction ont été réalisés afin d'isoler les métabolites. Le procédé d'extraction I correspond à une extraction fractionnée ayant recours à plusieurs solvants, de polarités croissantes, de manière à extraire le maximum de métabolites de la matrice. Le procédé d'extraction II consiste à des extractions à l'eau directement sur le fromage délipidé (au cyclohexane), l'eau étant considérée comme un solvant vert, permettant de développer un procédé d'extraction plus respectueux de l'environnement, pour une application industrielle. Le procédé d'extraction III consiste à extraire directement le fromage avec de l'eau, sans délipidation préalable au cyclohexane.

Les procédés d'extractions I et II sont résumés sur la Figure 18.

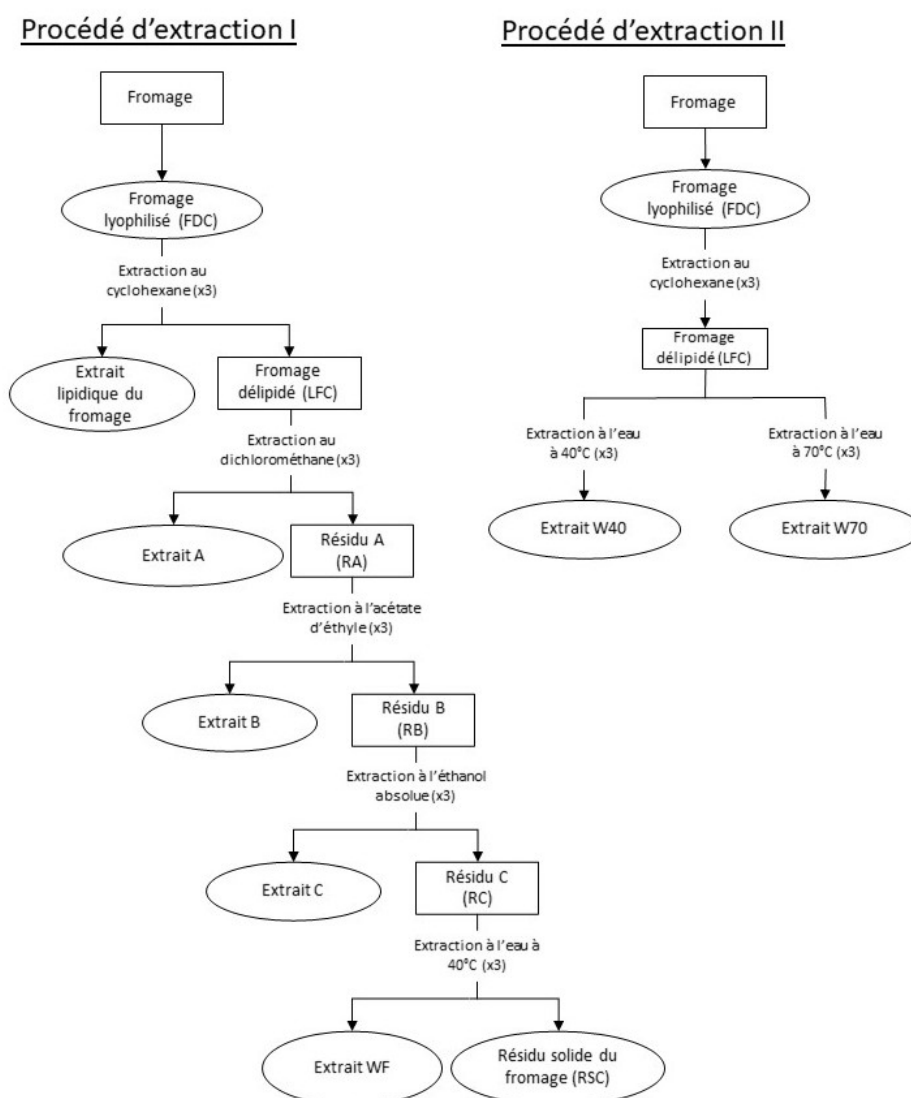


Figure 18 : Préparation des extraits de fromage.

Les ovales indiquent les extraits de fromages conservés pour les tests biologiques (Fromage lyophilisé, extrait lipidique du fromage, extraits A, B, C, WF, W40, W70 et résidu solide du fromage).

### **2.1.1. Extraction des constituants apolaires**

Le protocole d'extraction de la partie apolaire du fromage a été adapté des méthodes de Bligh and Dyer (1959), Folch *et al.* (1957) et Manirakiza *et al.* (2001) [144–146]. Le fromage lyophilisé a été placé dans du cyclohexane distillé (ratio 1/10 w/w) à 20 °C sous agitation mécanique pendant 4 h. L'ensemble a ensuite été filtré et le filtrat évaporé. L'extrait obtenu a été dissous dans du cyclohexane (ratio 1/10 w/v), filtré pour éliminer les résidus de fromage puis le solvant a été évaporé. L'extraction a été répétée à nouveau 2 fois dans les mêmes conditions mais avec des durées différentes (2 h, 1 h) afin d'épuiser la matrice. Les différents extraits secs ont été rassemblés afin d'obtenir l'extrait final, nommé « extrait apolaire du fromage » (cheese lipid extract en anglais). Le fromage délipidé (lipid-free cheese (LFC) en anglais) a été conservé pour la suite de l'extraction (Figure 18).

### **2.1.2. Procédé d'extraction I**

Une extraction fractionnée a été réalisée sur le fromage délipidé pour extraire de façon optimale les métabolites. Pour cela, le procédé consistait à réaliser 4 extractions solide/liquide successives, en augmentant la polarité du solvant utilisé à chaque étape et dans l'ordre suivant : dichlorométhane, acétate d'éthyle, éthanol absolue et eau (Figure 18).

Le fromage délipidé a été placé avec du dichlorométhane distillé (ratio 1/10 w/v) à 20 °C sous agitation mécanique pendant 4 h. L'ensemble a ensuite été filtré et le filtrat évaporé. L'extrait obtenu a été dissous dans du dichlorométhane (ratio 1/10 w/v), filtré pour éliminer les résidus de fromage puis le solvant a été évaporé. L'extraction a été répétée à nouveau 2 fois dans les mêmes conditions mais avec des durées différentes (2 h, 1 h) afin d'épuiser la matrice. Les différents extraits secs sont rassemblés afin d'obtenir l'extrait final, nommé A. Le résidu nommé RA a été conservé pour la suite de l'extraction.

Le résidu RA a été placé avec de l'acétate d'éthyle distillé (ratio 1/10 w/v) à 20 °C sous agitation mécanique pendant 4 h. L'ensemble a ensuite été filtré et le filtrat évaporé. L'extrait obtenu a été dissous dans de l'acétate d'éthyle (ratio 1/10 w/v), filtré pour éliminer les résidus de fromage puis le solvant a été évaporé. L'extraction a été répétée à nouveau 2 fois dans les mêmes conditions mais avec des durées différentes (2 h, 1 h) afin d'épuiser le résidu. Les différents extraits secs ont été rassemblés afin d'obtenir l'extrait final, nommé B. Le résidu nommé RB a été conservé pour la suite de l'extraction.

Le résidu RB a été placé avec de l'éthanol absolu (ratio 1/10 w/v) à 20 °C sous agitation

mécanique pendant 4 h. L'ensemble a ensuite été filtré et le filtrat évaporé. L'extrait obtenu a été dissous dans de l'éthanol absolu (ratio 1/10 w/v), filtré pour éliminer les résidus de fromage puis le solvant a été évaporé. L'extraction a été répétée à nouveau 2 fois dans les mêmes conditions mais avec des durées différentes (2 h, 1 h) afin d'épuiser le résidu. Les différents extraits secs ont été rassemblés afin d'obtenir l'extrait final, nommé C. Le résidu nommé RC a été conservé pour la suite de l'extraction.

Le protocole d'extraction avec de l'eau sur le résidu RC a été adapté de la méthode de Polychroniadou *et al.* (1999) et Huma *et al.* (2018) [147,148]. Le résidu RC a été placé avec de l'eau HPLC (ratio 1/10 w/v) sous agitation mécanique et a été maintenu à 40 °C pendant 1 h. Après centrifugation (8000 rpm, 15 minutes ; Avanti J26S XPI, Beckman Coulter, Brea, USA), le surnageant a été concentré sous vide, filtré puis le solvant a été évaporé avant de sécher l'ensemble sous vide. L'extraction a été répétée 2 fois dans les mêmes conditions afin d'épuiser le résidu. Les différents extraits secs ont été rassemblés afin d'obtenir l'extrait final, broyé au mortier et au pilon, et nommé WF.

Le résidu final de cette extraction, nommé résidu final du fromage (residual solid cheese (RSC) en anglais), a été broyé à la main au mortier et au pilon, avant d'être cryobroyé.

### **2.1.3. Procédé d'extraction II**

Le procédé d'extraction consistait à réaliser deux conditions d'extraction avec de l'eau sur le fromage délipidé, à deux températures différentes (40 °C et 70 °C), l'augmentation de la température impactant la nature des constituants qui pouvaient être extraits de la matrice (par exemple des protéines de masses plus importantes). Le fromage délipidé a été placé avec de l'eau HPLC (ratio 1/10 w/v) sous agitation mécanique et maintenu à 40 °C (ou 70 °C) pendant 1 h. Après centrifugation (8000 rpm, 15 minutes ; Avanti J26S XPI, Beckman Coulter, Brea, USA), le surnageant a été concentré sous vide, filtré puis le solvant a été évaporé avant de sécher le solide obtenu sous vide. L'extraction a été répétée 2 fois dans les mêmes conditions, pour chaque température, afin d'épuiser la matrice. Les différents extraits secs ont été rassemblés afin d'obtenir l'extrait final, broyé au mortier et au pilon, et nommé W40 (extraction à 40 °C) ou W70 (extraction à 70 °C).

### **2.1.4. Procédé d'extraction III**

Ce procédé d'extraction consistait à réaliser deux conditions d'extraction avec de l'eau

directement sur le fromage lyophilisé, à deux températures différentes (40 °C et 70 °C). Les conditions d'extraction sont identiques à celles appliquées dans le procédé d'extraction II.

Chaque extrait était conservé à -25 °C sous argon dans un récipient étanche jusqu'à utilisation.

## 2.2. Extraction du lait

### 2.2.1. Extraction des constituants apolaires

Le protocole d'extraction de la partie apolaire du lait est le même que celui appliqué au fromage. Le lait lyophilisé a été placé dans du cyclohexane distillé (ratio 1/10 w/w) à 20 °C sous agitation mécanique pendant 4 h. L'ensemble a ensuite été filtré et le filtrat évaporé. L'extrait obtenu a été dissous dans du cyclohexane (ratio 1/10 w/v), filtré puis le solvant a été évaporé. L'extraction a été répétée à nouveau 2 fois dans les mêmes conditions mais avec des durées différentes (2 h, 1 h) afin d'épuiser la matrice. Les différents extraits secs ont été rassemblés afin d'obtenir l'extrait final, nommé « extrait apolaire du lait » (milk lipid extract en anglais). Le lait délipidé (lipid-free milk (LFM) en anglais) a été conservé à la fois en tant qu'extrait, mais également pour la suite de l'extraction (Figure 19).

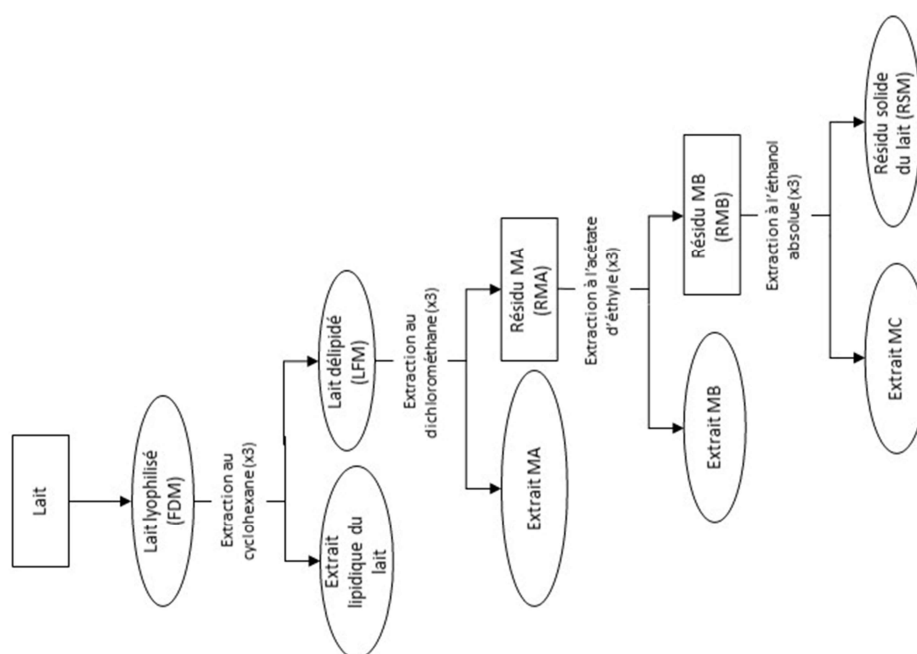


Figure 19 : Préparation des extraits de lait.

*Les ovalets indiquent les extraits de lait conservés pour les tests biologiques (Lait lyophilisé, extrait lipidique du lait, lait délipidé, extraits MA, MB, MC, et résidu solide du lait).*



### **2.2.2. Extraction fractionnée du lait**

Le lait délipidé a subi le même protocole d'extraction fractionnée que celui appliqué au fromage (procédé d'extraction I). Le procédé se différencie néanmoins du précédent (sur le fromage) car il ne comporte que 3 extractions solide/liquide successives dans l'ordre suivant : dichlorométhane, acétate d'éthyle, éthanol absolue (Figure 19).

Le lait délipidé a été placé avec du dichlorométhane distillé (ratio 1/10 w/v) à 20 °C sous agitation mécanique pendant 4 h. L'ensemble a ensuite été filtré et le filtrat évaporé. L'extrait obtenu a été dissous dans du dichlorométhane (ratio 1/10 w/v), filtré puis le solvant a été évaporé. L'extraction a été répétée à nouveau 2 fois dans les mêmes conditions mais avec des durées différentes (2 h, 1 h) afin d'épuiser la matrice. Les différents extraits secs sont rassemblés afin d'obtenir l'extrait final, nommé MA. Le résidu nommé RMA est conservé pour la suite de l'extraction.

Le résidu RMA a été placé avec de l'acétate d'éthyle distillé (ratio 1/10 w/v) à 20 °C sous agitation mécanique pendant 4 h. L'ensemble a ensuite été filtré et le filtrat évaporé. L'extrait obtenu a été dissous dans de l'acétate d'éthyle (ratio 1/10 w/v), filtré puis le solvant a été évaporé. L'extraction a été répétée à nouveau 2 fois dans les mêmes conditions mais avec des durées différentes (2 h, 1 h) afin d'épuiser le résidu. Les différents extraits secs ont été rassemblés afin d'obtenir l'extrait final, nommé MB. Le résidu nommé RMB est conservé pour la suite de l'extraction.

Le résidu RMB a été placé avec de l'éthanol absolu (ratio 1/10 w/v) à 20 °C sous agitation mécanique pendant 4h. L'ensemble a ensuite été filtré et le filtrat évaporé. L'extrait obtenu a été dissous dans de l'éthanol absolu (ratio 1/10 w/v), filtré puis le solvant a été évaporé. L'extraction a été répétée à nouveau 2 fois dans les mêmes conditions mais avec des durées différentes (2 h, 1 h) afin d'épuiser le résidu. Les différents extraits secs ont été rassemblés afin d'obtenir l'extrait final, nommé MC. Le résidu solide du lait a été séché sous vide et nommé « résidu solide du lait » (residual solid milk (RSM) en anglais).

Chaque extrait sec de lait a été conservé dans un récipient étanche à -25 °C, sous argon.

### 3. Évaluation de l'activité biologique des extraits

#### 3.1. Expérimentation *in vivo* avec le modèle *Caenorhabditis elegans*

##### 3.1.1. Culture d'*Escherichia coli* OP50 vivant et préparation de la bactérie « Heat-Killed »

La souche *Escherichia coli* OP50 a été obtenue auprès du *Caenorhabditis Genetic Center* (University of Minnesota, USA). La bactérie a été cultivée pendant 24 h à 37 °C dans du bouillon Luria-Bertani (Laboratorios Conda S.A., Espagne) puis conservée à 4 °C jusqu'à utilisation.

Lors des expérimentations, les vers ont été nourris avec la bactérie morte afin d'éviter toute interaction entre elle et les extraits. Pour cela, la souche a été cultivée à l'identique puis récoltée par centrifugation (4000 tr/min, 15 minutes). L'ensemble des culots a été suspendu dans du tampon M9 (composition en [Annexe 2](#)) à une concentration de 100 mg/mL, puis placé dans un bain marie à 70 °C pendant 1 h. La solution a été refroidie et conservée à 4 °C jusqu'à utilisation.

##### 3.1.2. Souches de *Caenorhabditis elegans*

L'ensemble des souches de nématode utilisé au cours des études a été obtenu auprès du *Caenorhabditis Genetic Center* (University of Minnesota, USA). Le Tableau 3 répertorie le nom des souches employées, ainsi que leur génotype.

Tableau 3 : Liste des souches de *Caenorhabditis elegans*

Nom de la souche	Génotype	Caractéristique
N2	Sauvage	
TJ356	<i>zls356 IV [daf-16p::<i>daf-</i></i>	Fluorescent DAF-16:: <i>GFP</i>
	<i>16a/b::<i>GFP</i> + <i>rol-6(su1006)</i></i>	Croissance et reproduction lentes
GR1307	<i>daf-16(mgDf50) I</i>	Pas d'expression de <i>daf-16</i>
IG10		Mutation du gène <i>tol-1</i>
	<i>tol-1(nr2033) I</i>	Exhibit a lowly penetrant lethality and a small proportion of the mutants arrests as early larvae

Toutes les souches de nématode ont été conservées à 20 °C pour leur entretien et au cours des expérimentations.

### **3.1.3. Entretien de *Caenorhabditis elegans***

Les différentes souches de vers ont été maintenues et développées sur Nematode Growth Medium (NGM) (composition en [Annexe 2](#)).

Pour cela, 100 µL de culture d'*E. coli* en bouillon LB ont été déposés sur des boîtes contenant du milieu NGM puis étalés avec un râteau à ensemercer. Les boîtes ont ensuite été incubées à 37 °C pendant 24 h. Avant l'ensemencement des vers, les boîtes ont été sorties et refroidies à température ambiante.

Afin de transférer les nématodes, ceux-ci ont d'abord été récoltés en déposant 5 mL de tampon M9 sur leur milieu. La suspension a été transférée dans un tube à fond conique de 50 mL et centrifugée à 1500 tr/min pendant 2 minutes. Le culot obtenu a été prélevé et déposé sur les boîtes NGM préparées la veille. Les boîtes ont été conservées à l'étuve à 20 °C jusqu'à utilisation.

### **3.1.4. Synchronisation de la population de *Caenorhabditis elegans***

Afin d'éviter un biais dans les études dû à la différence d'âge au sein d'une population, une synchronisation de la population de vers a été réalisée avant chaque expérimentation. Celle-ci a été réalisée à partir d'une population ayant libéré des œufs dans le milieu ou ayant des vers gravides.

Les vers et les œufs ont été récoltés en déposant 5 mL de tampon M9 sur leur milieu. La suspension a été transférée dans un tube à fond conique de 50 mL et centrifugée à 1500 tr/min pendant 2 minutes. Le surnageant a été délicatement retiré puis le culot est re suspendu dans 5 mL de « Worm Bleach » (2.5 mL de tampon M9, 1.5 mL d'eau de javel et 1 mL de NaOH 5 M). L'ensemble a été vigoureusement agité pendant 3 minutes au vortex ou jusqu'à rupture de l'intégrité de la cuticule du ver. L'action du « Worm Bleach » a été arrêté en ajoutant 40 mL de tampon M9 au milieu puis en centrifugeant (1500 tr/min, 2 min). Le surnageant a été délicatement retiré et le culot a été lavé 2 fois avec 20 mL de tampon M9. A chaque lavage la suspension a été centrifugée et le surnageant délicatement retiré. Les œufs ont finalement été suspendus dans 20 mL de M9 pendant 24 h à 20 °C sous agitation modérée afin de permettre leur éclosion. Une fois éclos les larves L1 ont été récupérées par centrifugation (1500 tr/min, 2

min) et transférées sur un milieu NGM préalablementensemencé avec *E. coli* OP50 (100 µL par boîte, incubation à 37 °C, pendant 24 h). Les vers ont été placés à 20 °C pendant 48 h (72 h pour la souche TJ356) afin qu'ils atteignent le stade L4 correspondant à l'âge adulte.

### **3.1.5. Étude de la longévité des vers en présence des extraits de fromage ou de lait**

Un milieu gélosé (composition en [Annexe 2](#)) a été préparé et stocké à 55 °C jusqu'à utilisation. Avant de couler les puits, le milieu a été refroidi à 40 °C et conservé à cette température jusqu'à ce que toutes les conditions aient été préparées. Du FuDR a été ajouté dans le milieu pour une concentration finale de 0.12 mM, afin d'éviter l'éclosion des œufs au cours de l'étude. Le milieu gélosé a été divisé en plusieurs aliquots de 2 mL qui ont été individuellement supplémentés avec des extraits secs de fromage ou de lait à la concentration massique désirée. La quantité d'extrait sec à apporter en fonction de la concentration choisie est indiquée dans le Tableau 4.

*Tableau 4* : Masse d'extrait sec (mg) à introduire dans le milieu gélosé pour obtenir le pourcentage massique (% w/v) désirée lors des études sur *C. elegans*

<b>Pourcentage massique de fraction dans la gélose (%)</b>	<b>Masse d'extrait à peser en mg (pour 2 mL de milieu)</b>	<b>Pourcentage massique de fraction dans la gélose (%)</b>	<b>Masse d'extrait à peser en mg (pour 2 mL de milieu)</b>
<b>0.1</b>	2	<b>1.1</b>	22
<b>0.2</b>	4	<b>1.2</b>	24
<b>0.3</b>	6	<b>1.3</b>	26
<b>0.4</b>	8	<b>1.4</b>	28
<b>0.5</b>	10	<b>1.5</b>	30
<b>0.6</b>	12	<b>1.6</b>	32
<b>0.7</b>	14	<b>1.7</b>	34
<b>0.8</b>	16	<b>1.8</b>	36
<b>0.9</b>	18	<b>1.9</b>	38
<b>1</b>	20	<b>2</b>	40

Le milieu supplémenté a été homogénéisé à l'aide d'ultrasons et par vortexage, avant de le couler dans des plaques 24-puits (3 puits par condition, 500 µL de milieu par puits). La plaque a ensuite été transférée sur de la glace pour que la gélose prenne en masse. Afin d'éviter tout développement fongique, de l'amphotéricine B (250 µg/mL) a été ajouté dans les conditions à

risques, pour une concentration finale de 1.6 µg/mL. Les plaques ont été conservées à 4 °C jusqu'à utilisation. Avant le début d'une expérience, les plaques ont été sorties 30 minutes avant afin qu'elles reviennent à température ambiante.

Les vers L4 ont été récoltés et déposés sur les puits (environ 15-20 vers par puits) avec de la nourriture (20 µL d'une suspension de 100 mg/mL de HK *E. coli* OP50). Les plaques ont été placées à 20 °C pour toute la durée de l'étude. Les vers ont été nourris tous les 3 jours avec la même quantité de bactéries mortes. Les vers vivants ont été comptés quotidiennement jusqu'à la mort de tous les nématodes. Un ver était considéré comme mort lorsqu'il ne réagissait pas à une stimulation mécanique douce. Cet essai a été réalisé sous forme d'au moins 4 expériences indépendantes.

Cette étude a été réalisée avec les souches de *C. elegans* N2 et GR1307.

### **3.1.6. Étude de l'impact des extraits de fromage ou de lait sur la survie du ver sur milieu oxydant**

Un milieu gélosé (composition en [Annexe 2](#)) a été préparé et stocké à 55 °C jusqu'à utilisation. Avant de couler les puits, le milieu a été refroidi à 40 °C et conservé à cette température jusqu'à ce que toutes les conditions aient été préparées. Du FuDR a été ajouté dans le milieu pour une concentration finale de 0.12 mM, afin d'éviter l'éclosion des œufs au cours de l'étude. Le milieu gélosé a été divisé en plusieurs aliquots de 2 mL qui ont été individuellement supplémentés avec des extraits secs de fromage ou de lait à la concentration massique désirée. La quantité d'extrait sec à apporter en fonction de la concentration choisie est indiquée dans le Tableau 4. Le milieu supplémenté a été homogénéisé à l'aide d'ultrasons et par vortexage. La nourriture (40 µL d'une suspension de 100 mg/mL de HK *E. coli* OP50) a été ajoutée dans le milieu avant de le couler dans des plaques 24-puits (3 puits par condition, 500 µL de milieu par puits) et de transférer la plaque sur de la glace pour que la gélose prenne en masse. Afin d'éviter tout développement fongique, de l'amphotéricine B (250 µg/mL) a été ajoutée dans les conditions à risques pour une concentration finale de 1.6 µg/mL. Les plaques ont été conservées à 4 °C jusqu'à utilisation. Avant le début d'une expérience, les plaques ont été sorties 30 minutes avant afin qu'elles reviennent à température ambiante.

Les vers L4 ont été récoltés et déposés sur les puits (environ 50 vers par puits). Les plaques ont été placées à 20 °C pendant 5 jours. Après cette période d'incubation, les vers ont été transférés sur un milieu gélosé contenant ou non du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (3 mM). Les

vers vivants ont été comptés au moment du transfert ( $t = 0$  h) et après 3 h 30 d'incubation ( $t = 3$  h 30). Le taux de survie a été exprimé selon l'Équation 1 :

$$\text{Équation 1 : } \tau = \frac{\left(\frac{n_{\text{versvivant}\hat{t}=3h3}}{n_{\text{versvivant}\hat{t}=0h}}\right)_{\text{milieuavecH}_2\text{O}_2}}{\left(\frac{n_{\text{versvivant}\hat{t}=3h30}}{n_{\text{versvivant}\hat{t}=0h}}\right)_{\text{O}_2}}$$

Un ver a été considéré comme mort lorsqu'il ne réagissait pas à une stimulation mécanique douce. Cet essai a été réalisé sous forme d'au moins 4 expériences indépendantes. Cette étude a été réalisée avec les souches de *C. elegans* N2, IG10 et GR1307.

### **3.1.7. Étude de l'impact des extraits de fromage sur la translocation du facteur de transcription DAF-16::GFP**

Un milieu gélosé (composition en [Annexe 2](#)) a été préparé et stocké à 55 °C jusqu'à utilisation. Avant de couler les puits, le milieu a été refroidi à 40 °C et conservé à cette température jusqu'à ce que toutes les conditions aient été préparées. Le milieu a été supplémenté avec du cholestérol (5 mg/L), CaCl<sub>2</sub> (1 mM), MgSO<sub>4</sub> (1 mM) et du tampon de phosphate de potassium à pH 6 (25 mL d'une solution à 1 M pour 1 L de milieu). Le milieu gélosé a été divisé en plusieurs aliquots de 2 mL qui ont été individuellement supplémentés avec des extraits secs de fromage à la concentration massique désirée. La quantité d'extrait sec à apporter en fonction de la concentration choisie est indiquée dans le Tableau 4. Le milieu supplémenté a été homogénéisé à l'aide d'ultrasons et vortex, avant de le couler dans des plaques tout en le conservant à 40 °C afin d'éviter que la gélose ne prenne en masse. Une fois homogène, l'aliquot a été coulé dans les plaques 24-puits (3 puits par condition, 500 µL de milieu par puits). La plaque a ensuite été transférée sur de la glace pour que la gélose prenne en masse. Chaque plaque a ensuite été conservée à 4 °C jusqu'à utilisation. Les plaques ont été sorties 30 minutes avant le début d'une expérience afin qu'elles reviennent à température ambiante.

L'étude de la localisation du facteur de transcription DAF-16 a été réalisée selon Fatima *et al.* (2014) en utilisant la souche *C. elegans* transgénique TJ356 [168]. Ce mutant exprime de manière constitutive DAF-16::GFP. Les vers L4 ont été récoltés et déposés sur les puits (environ 20 vers par puits) avec de la nourriture (20 µL d'une suspension de 100 mg/mL de HK *E. coli* OP50). Ils ont été incubés pendant 2 h et 4 h à 20 °C. 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 au grossissement X40 (Evos FL, Invitrogen).

### **3.1.8. Détermination de l'expression des gènes d'intérêt**

La détermination de l'expression des gènes d'intérêt a été réalisée à 2 temps d'incubation, choisis par rapport aux résultats obtenus lors de l'étude de longévité : à 3 jours (début du déclin de la population de vers de la condition témoin) et 10 jours (médiane de survie de la population de vers de la condition témoin).

#### **3.1.8.1. Incubation des vers avec les extraits de fromage**

Un milieu gélosé (composition en [Annexe 2](#)) a été préparé et stocké à 55 °C jusqu'à utilisation. Avant de couler les puits, le milieu a été refroidi à 40 °C et conservé à cette température jusqu'à ce que toutes les conditions aient été préparées. Du FuDR a été ajouté dans le milieu pour une concentration finale de 0.12 mM, afin d'éviter l'éclosion des œufs au cours de l'étude. Le milieu gélosé a été divisé en plusieurs aliquots de 10 mL qui ont été individuellement supplémentés avec des extraits secs de fromage à la concentration massique désirée. La quantité d'extrait sec à apporter en fonction de la concentration choisie est adaptée par rapport à la valeur indiquée dans le Tableau 4 (valeur calculée pour 2 mL de milieu). Le milieu supplémenté a été homogénéisé à l'aide d'ultrasons et par vortexage, avant de le couler dans des petites boîtes de pétri (1 par répliqua et par temps) et de transférer la plaque sur de la glace pour que la gélose prenne en masse. Afin d'éviter tout développement fongique, de l'amphotéricine B (250 µg/mL) a été ajoutée dans les conditions à risques pour une concentration finale de 1.6 µg/mL. Les plaques ont été conservées à 4 °C jusqu'à utilisation. Avant le début d'une expérience, les plaques ont été sorties 30 minutes avant afin qu'elles reviennent à température ambiante.

Les vers L4 ont été récoltés et déposés sur les boîtes (environ 500 vers pour 3 jours et 1000 vers pour 10 jours) avec de la nourriture (1000 µL d'une suspension de 100 mg/mL de HK *E. coli* OP50 pour 3 jours, 1500 µL pour 10 jours). Les boîtes ont été placées à 20 °C pour 3 jours ou 10 jours.

Cette étude a été réalisée avec la souche *C. elegans* N2.

#### **3.1.8.2. Extraction des ARN**

Après 3 ou 10 jours d'incubation les vers ont été collectés avec du M9 puis centrifugés afin de retirer délicatement le surnageant. L'ARN a été récupéré par extraction en ajoutant 500 µL

de TRIzol au culot avant de transférer l'ensemble dans un tube contenant des microbilles de verre (PowerBead Tubes Glass 0.1 mm, Mo Bio Laboratories, USA). Les vers ont été lysés à l'aide du Precellys® 24 (Bertin instruments, Montigny-le-Bretonneux, France) en effectuant 2 cycles de 30 secondes. Le tube a été centrifugé (14000 tr/min, 1 min) (Eppendorf® 5415D, Hamburg, Germany), et le surnageant a été délicatement récupéré. 100 µL de chloroforme ont été ajoutés avant de vortexer pendant 30 secondes et de laisser incuber 3 minutes à température ambiante. Les tubes ont ensuite été centrifugés (12000 tr/min, 15 min, 4 °C) et la phase phénolique rose a été retirée. La phase incolore restante a été traitée de nouveau avec du chloroforme. Le second surnageant incolore a été placé avec 250 µL d'isopropanol afin de faire précipiter l'ARN. Les tubes ont été incubés à température ambiante pendant 4 minutes avant centrifugation (12000 tr/min, 10 min, 4 °C). Le surnageant a été retiré et l'ARN a été lavé avec 1000 µL d'éthanol à 70 %. Après centrifugation (14000 tr/min, 5 min, 4 °C) le surnageant a été retiré et l'ARN a été dissous dans 20 µL d'eau RNase-free.

### **3.1.8.3. Reverse transcription des ARN en ADNc**

Une étape de reverse transcription a été réalisée sur les ARN extrait afin d'obtenir les ADNc correspondants. Cette étape a été réalisée au moyen du kit « High-Capacity cDNA Archive Kit » (Applied Biosystems, USA). La réaction de polymérisation a été effectuée dans un tube de 0.2 mL avec les réactifs suivants :

- 5 µL de tampon 10X
- 2 µL de dNTP 25X
- 5 µL de random primers 10X
- 2.5 µL de reverse transcriptase
- 0.5 à 2 µg d'ARN, qsp 35.5 µL d'eau RNase-free

La « reverse transcription » a été effectuée dans un thermocycleur 3Prime (TECHNE®, Royaume-Uni) selon le programme suivant :

- 10 minutes à 25°C
- 120 minutes à 37°C
- Conservation à 10°C



### 3.1.8.4. PCR quantitative

Une PCR quantitative a été réalisée sur l'ADNc afin d'évaluer l'expression des gènes d'intérêt. Pour cela, chaque échantillon était constitué des réactifs suivant :

- 6.25 µL de mix qPCR (Rotor Gene® SYBR® Green PCR kit)
- 1.25 µL d'amorce sens
- 1.25 µL d'amorce antisens
- 1.25 µL d'eau RNase-free
- 2.5 µL d'ADNc (ou d'eau RNase-free pour le contrôle négatif NTC)

Les séquences des amorces sens et antisens des gènes étudiés sont indiquées dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Séquences des oligonucléotides utilisés comme amorces en PCR quantitative

Nom du gène	Type de gène	Séquence amorce sens (5'-3')	Séquence amorce antisens (5'-3')	Referen ce
Y45F10	Référen ce	CGAGAACCCGCGAAATGTC	CGGTTGCCAGGGAAGATGA	[169]
D.4	ce	GGA	GGC	
<i>daf-16</i>	Intérêt	TTCAATGCAAGGAGCATTT	AGCTGGAGAAACACGAGA	[169,170]
		G	CG	]
<i>sek-1</i>	Intérêt	GCCGATGGAAAGTGGTTTT	TAAACGGCATCGCCAATAA	[169,170]
		A	T	]
<i>pmk-1</i>	Intérêt	CCGACTCCACGAGAAGGAT	AGCGAGTACATTCAGCAGC	[169,170]
		A	A	]

Un triplicat a été réalisé pour chaque échantillon. La réaction de qPCR ainsi que le suivi de l'amplification ont été 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 T<sub>m</sub>
  - 60 secondes à 72 °C
  - Gradient de température de 65 °C à 95 °C
- } Cycle répété 35 fois

L'expression finale des gènes d'intérêt ( $E_{GOI}$ ) a été déterminée à partir de l'[Équation 2](#) :

$$\text{Équation 2 : } E_{GOI} = \frac{(GOI \text{ efficacité})^{\Delta Ct_{GOI}}}{(Y45F10D.4 \text{ efficacité})^{\Delta Ct_{Y45F10D.4}}}$$

### 3.2. Etude in vitro

Les expérimentations *in vitro* (sur leucocytes humains) ont été réalisées par l'équipe ECREIN à la faculté de Pharmacie de Clermont-Ferrand.

#### 3.2.1. Viabilité cellulaire (leucocytes humains)

Le sang a été prélevé auprès de volontaires en bonne santé (n = 6 ; Etablissement Français du Sang, EFS, Clermont-Ferrand, France). Les leucocytes ont été obtenus par choc hémolytique à l'aide d'une solution de chlorure d'ammonium (NH<sub>4</sub>Cl, 155 μM; NaHCO<sub>3</sub> 12 μM, EDTA 0.01 μM). Les leucocytes ont ensuite été lavés avec du RPMI, centrifugés (400 g, 10 min) et re-suspendus dans du RPMI. La préparation cellulaire a été ajustée à 106 cellules/mL avec du RPMI supplémenté (FBS 10%, gentamicin 50 μg/mL and Gln 2 mM). Les cellules ont ensuite été placées dans des plaques 96-puits en polystyrènes (Cell Wells™, Corning, NY) avec les extraits secs de fromage (0, 10, 50, 100 ou 200 μg/mL), du PMA (1 μM) et de la résazurine (25 μg/mL). La fluorescence (excitation/émission : 544/590 nm) a été enregistrée toutes les 30 minutes pendant 2 h à l'aide du fluoromètre Fluoroskan Ascent FL® (ThermoFisher Scientific, Illkirch, France).

#### 3.2.2. Suivi de la production de radicaux libres par les leucocytes humains

Le sang a été prélevé auprès de volontaires en bonne santé (n = 6). Les leucocytes ont été obtenus et ajustés comme précédemment. Les cellules ont été placées dans des plaques 96-puits en polystyrènes (Cell Wells™, Corning, NY) avec les extraits secs de fromage (0, 10, 50, 100 ou 200 μg/mL), de la dihydrorhodamine 123 (1 μM) et stimulées avec 1 μM de PMA pendant

120 minutes. L'intensité de fluorescence de la rhodamine 123 (excitation/émission : 485/538 nm), qui est le produit de l'oxydation de la dihydrorhodamine 123 par les radicaux libres, a été enregistré toutes les 5 minutes pendant 2 h à l'aide du fluoromètre Fluoroskan Ascent FL®.

### **3.3. Analyses statistiques**

Les données de survies de *C. elegans* ont été analysées à l'aide de la méthode de Kaplan-Meier. Les différences ont été déterminées sur R (version 3.6.0) à l'aide du test du log-rank. Les différences entre les conditions lors de l'étude de la survie sur milieu oxydant, l'analyse par qPCR, la viabilité cellulaire ou la production de radicaux libres intracellulaire ont été déterminées en utilisant le test de Kruskal-Wallis suivi du test de Dunn non corrigé sur GraphPad Prism (version 8.2.1 pour Windows) (GraphPad Software, La Jolla, California, USA).

Les différences ont été considérées comme significative lorsque la *p*-value était inférieure à 0.05.

## **4. Étude de la composition chimique des extraits de fromage et de lait**

### **4.1. Analyse GC-MS des acides gras de l'extrait apolaire issu du fromage**

#### **4.1.1. Dérivatisation des acides gras de l'extrait apolaire en ester**

100 mg d'extrait apolaire ont été dissous dans 2 mL de cyclohexane puis 0.5 mL d'hydroxyde de potassium à 0.5 M dans le méthanol ont été ajoutés. Le mélange a été porté à reflux pendant 5 minutes et laissé refroidir. Une fois froid, 0.5 mL d'acide chlorhydrique à 0.5 M dans le méthanol ont été ajoutés, suivis de 2 mL de cyclohexane. La solution a été séchée à l'aide de sulfate de sodium puis filtrée à 0.45 µm dans un vial GC-MS.

#### **4.1.2. Paramètres d'analyse en GC-MS**

- Appareil : GC-MS QP2010 SE, Shimadzu
  - Colonne : MEGA-5-MS, 30m x 0.25mm ; 0.25µm
  - Volume d'injection : 1 µL en mode split ratio 40 :1
  - Gaz vecteur : Hélium
  - Température d'injecteur : 280 °C
  - Pression : 60 kPa

- Débit injecteur : 49.7 mL/min
- Débit de colonne : 5 mL/min
- Température colonne : voir Tableau 6

Tableau 6 : Rampe de température de la colonne au cours de l'analyse par GC-MS

Temps (min)	Température de la colonne (°C)
0	50
1	50
9.32	300
11.32	300

## 4.2. Analyse LC-MS des extraits aqueux et éthanoliques de fromage et de lait

### 4.2.1. Séparation de la partie « grasse » de l'extrait éthanolique

L'extrait éthanolique possède une consistance plutôt « grasse », provoquant des problèmes de solubilité de l'extrait, rendant l'analyse de l'extrait impossible. Afin de pouvoir obtenir la composition de l'extrait, une étape de séparation a été effectuée.

L'extrait a été dissous dans de l'eau pure (ratio 1/10 w/v), à l'aide d'ultrason si besoin. Le volume équivalent de cyclohexane a ensuite été ajouté puis le mélange agité à l'aide d'une ampoule à décanter. La phase aqueuse a été récupérée et lavée deux fois avec le même volume de cyclohexane. Les différentes phases organiques ont été rassemblées, puis lavées deux fois avec le volume équivalent d'eau.

Les différentes phases aqueuses ont été récupérées et rassemblées, ainsi que l'émulsion pouvant apparaître à l'interstice entre les deux phases. L'ensemble a été centrifugé (5 min, 4500 tr/min ; 2 fois) et la phase supérieure transférée (correspondant aux traces de cyclohexane restants dans la phase aqueuse et l'émulsion) avec la phase organique. La phase aqueuse a ensuite été filtrée sur coton puis le solvant a été évaporé avant de sécher l'ensemble sous vide. L'extrait sec ainsi obtenu est nommé C-FL.

Les différentes phases organiques ont été rassemblées, filtrées sur coton puis le solvant

éaporé avant de sécher l'ensemble sous vide. L'extrait sec ainsi obtenu est nommé C-L.

#### 4.2.2. Préparation des échantillons pour analyse LC-MS

Solubiliser l'échantillon dans de l'eau (extrait aqueux) ou du méthanol (extrait C-FL) pour une concentration finale de 2.5 mg/mL et filtrer à 0.45 µm dans un vial HPLC.

#### 4.2.3. Paramètres d'analyse LC-MS

- Appareil : Chaîne UHPLC Ultimate 3000 RSLC (ThermoScientific)
  - Colonne Uptisphere Strategy 300A C18-3; 250 x 4.6mm; 5µm (Interchim)
  - Débit : 0.8 mL/min
  - Four colonne : 40 °C
  - Volume d'injection : 10 µL
  - Gradient H<sub>2</sub>O (H<sup>+</sup>)/ ACN : voir Tableau 7
  - Détecteur DAD UV/VIS 3000 RS (ThermoScientific)
    - Longueur d'onde: 200 -> 400 nm
  - Orbitrap Q-Exactive (ThermoScientific)
    - Ionisation : ESI + et ESI -
    - Détection: 80 -> 1200 m/z

Tableau 7 : Gradient d'élution eau/acétonitrile pour l'analyse par LC-MS

Temps (min)	% H <sub>2</sub> O + 0.1%AF	% ACN
0	100	0
10	80	20
35	73	27
40	0	100
50	0	100
51	100	0
60	100	0

### **4.3. Extraction des pics des chromatogrammes LC-MS et prétraitement des données en vue de l'étude comparative des profils chimiques d'extraits**

L'extraction des données relatives à chaque chromatogramme des extraits non apolaires obtenus par LC-MS a été effectuée à l'aide du logiciel XCMS®, sur la plateforme en ligne Workflow4Metabolomics (W4M). Ces données ont ensuite été prétraitées pour les préparer en vue de l'analyse (imputation des valeurs manquantes et correction de la dérive analytique). L'ensemble des paramètres appliqués pour réaliser l'extraction et les prétraitements des données est présenté dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Paramètres appliquées pour l'extraction des pics des chromatogrammes à l'aide du logiciel XCMS®, et du prétraitement appliqué aux données pour les préparer en vue de l'analyse.

<b>Module</b>	<b>Paramètres</b>	
<b>xcmsSet</b>	<i>Extraction method</i>	CentWave
	<i>ppm deviation</i>	5
	<i>Peakwidth (min, max)</i>	5 ; 30
	<i>Signal to noise ratio cutoff</i>	6
	<i>Prefilter step for the first analysis step</i>	3 ; 1000000
	<i>Function to calculate the m/z center</i>	Peak apex
	<i>Integration method</i>	peak limits are found through descent on the mexican hat filtered data
	<i>Minimum difference in m/z for peaks with overlapping retention times</i>	0.008
	<i>Noise filter</i>	500000
<b>group</b>	<i>Method</i>	PeakDensity
	<i>bandwidth</i>	20
	<i>Minimum fraction of samples</i>	0.04
	<i>Minimum number of samples</i>	1
	<i>Width of overlapping m/z slices</i>	0.01
	<i>Get the peak list</i>	YES
	<i>Number of decimal for mass values</i>	4
	<i>Number of decimal for retention times values</i>	2
<b>retcor</b>	<i>Method</i>	PeakGroups
	<i>Minimum required fraction of samples in which peaks for the peak group were identified</i>	0.7
	<i>Maximal number of additional peaks for all samples to be assigned to a peak group for retention time correction</i>	1
	<i>Smooth method</i>	Loess
	<i>Degree of smothing for the loess fitting</i>	0.2
	<i>Family</i>	gaussian
<b>fillPeaks</b>	<i>Specifying a ppm by which the mz width of the peak region should be expanded</i>	5
	<i>Get the peak list</i>	YES
	<i>Number of decimal for mass values</i>	4
	<i>Number of decimal for retention times values</i>	2
	<i>Replace NA by 0</i>	YES

(Extraction et traitements réalisés sur la plateforme en ligne W4M)







*Troisième partie :*

*Résultats*



# Chapitre 1 : Développement d'une stratégie par bioguidage permettant l'étude de l'impact d'un caillé lactique caprin et de ses fractions sur la longévité du nématode *Caenorhabditis elegans*

L'allongement de l'espérance de vie se traduit notamment par une augmentation de l'apparition des affections liées au vieillissement, induisant une problématique de santé publique. Pour répondre à cela, le secteur de la santé (animale et humaine) est à la recherche de nouvelles molécules bioactives, notamment d'origine naturelle. Bien qu'elle reste peu explorée, la biodiversité microbienne — et ses métabolites — constitue une source importante de nouvelles molécules potentiellement bioactives et innovantes pouvant présenter un effet bénéfique sur la santé [135,171]. Les aliments fermentés, dont principalement le fromage au lait cru, ont déjà été étudiés pour leur riche biodiversité microbienne et notamment pour le rôle de cette dernière sur les qualités organoleptiques de l'aliment [8,31,172–176]. Cependant, les études restent limitées concernant l'effet de ces microorganismes sur la santé lorsqu'ils sont présents dans l'aliment, et peu de métabolites bioactifs d'origine microbienne ont été identifiés.

Au cours de cette étude nous avons développé une stratégie permettant d'évaluer l'effet biologique d'un fromage au lait cru (caillé lactique caprin) et des molécules qu'il contient. Cette stratégie comporte 3 étapes :

- La réalisation d'une chaîne d'extractions chimiques pour isoler les métabolites de la matrice fromagère lyophilisée. Ces extractions successives ont été réalisées à l'aide de 5 solvants, de polarité croissante, de manière à balayer l'ensemble de la gamme de polarités moléculaires : cyclohexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle, éthanol et eau. Au total, 9 extraits ont été obtenus : le fromage lyophilisé, un extrait apolaire (issu de l'extraction au cyclohexane), les extraits A (après extraction au dichlorométhane), B (après extraction à l'acétate d'éthyle), C (issu de l'extraction à l'éthanol), 3 extraits aqueux et le résidu final du fromage (Figure 20).

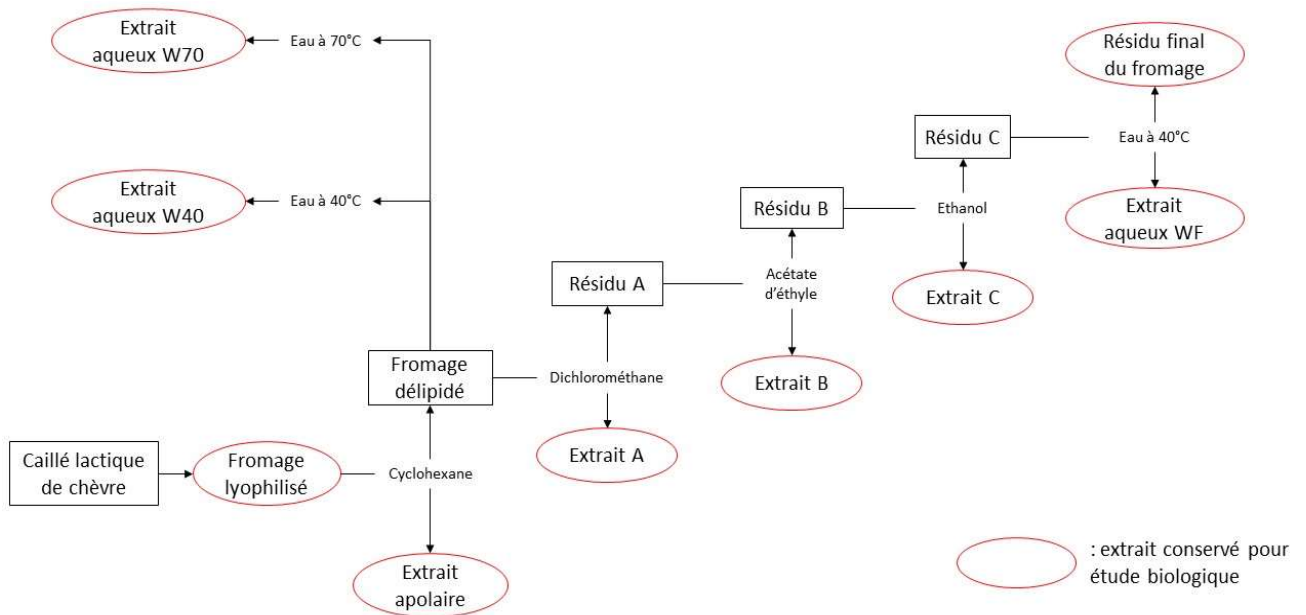


Figure 20 : Schéma récapitulatif de la série d'extractions chimiques réalisée à partir du caillé lactique de chèvre

Les ovales indiquent les 9 extraits obtenus, qui seront testés sur le crible biologique.

- Le développement et la mise au point d'une méthode pour apporter les extraits de fromage au ver *C. elegans* (modèle *in vivo* utilisé pour étudier les activités biologiques portées par les extraits à étudier), en supplémentant directement son milieu de culture.
- L'évaluation de l'impact des extraits sur la longévité du nématode par l'obtention et l'analyse comparative de courbes de survie (nématode cultivé sur milieu supplémenté en extrait *versus* nématode cultivé en condition témoin, sans supplémentation du milieu) (Figure 21). L'analyse de ces courbes de survie se focalise sur 4 principaux paramètres : la position relative des courbes, la médiane de survie, la longévité maximale et le pourcentage de population (nématode cultivé sur milieu supplémenté) encore en vie lorsque tous les individus de la condition témoin sont morts (Figure 21).

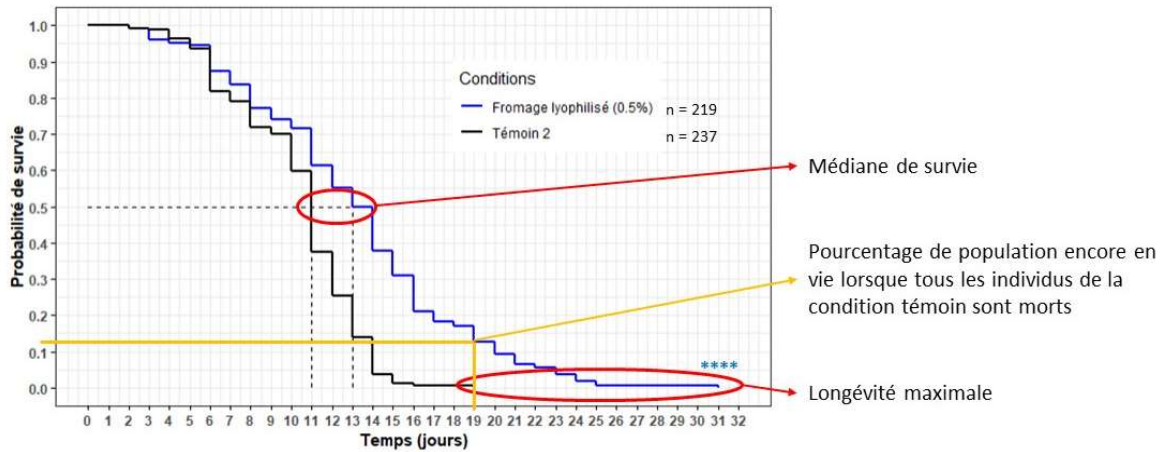


Figure 21 : Les différents paramètres des courbes de survie permettant d'évaluer l'impact de la supplémentation du milieu de culture du nématode avec un extrait de fromage

Les différents paramètres sont : la position relative des courbes, les médianes de survie, les longévités maximales et le pourcentage de population encore en vie sur le milieu supplémenté lorsque tous les individus de la condition témoin sont morts.

Les résultats obtenus montrent que, parmi les 9 extraits obtenus à partir du caillé caprin lyophilisé, 6 d'entre eux ont présenté un effet bénéfique, en augmentant significativement la longévité du nématode (analyse statistique réalisée avec le test du log-rank) : le fromage lyophilisé, l'extrait apolaire, les 3 extraits aqueux et le résidu de l'extraction. L'extrait C (éthanol) a présenté un effet toxique dans les premiers jours de l'expérience puis a montré un effet bénéfique sur la survie des vers ayant survécu, en augmentant leur longévité. Concernant les extraits A et B (issus respectivement des extractions au dichlorométhane et à l'acétate d'éthyle), ces derniers ont présenté un effet toxique rapide (mort des nématodes après contact avec les milieux de culture supplémentés).

Ce travail a donné lieu à une publication dans une revue internationale à comité de lecture [177].

**Development of an innovative methodology combining chemical fractionation and in vivo analysis to investigate the biological properties of cheese**

Guillaume Cardin, Isabelle Ripoché, Cyril Poupet, Muriel Bonnet, Philippe Veisseire, Pierre Chalard, Anne Chauder, Etienne Saunier, Julien Priam, Stéphanie Bornes, Laurent Rios

PLoS ONE (2020)

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242370>

# Development of an innovative methodology combining chemical fractionation and *in vivo* analysis to investigate the biological properties of cheese

Guillaume Cardin<sup>1\*</sup>, Isabelle Ripoche<sup>2</sup>, Cyril Poupet<sup>1</sup>, Muriel Bonnet<sup>1</sup>, Philippe Veisseire<sup>1</sup>,  
Pierre Chalard<sup>2</sup>, Anne Chauder<sup>3</sup>, Etienne Saunier<sup>3</sup>, Julien Priam<sup>3</sup>, Stéphanie Bornes<sup>1</sup>, Laurent  
Rios<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Université Clermont Auvergne, INRAE, VetAgro Sup, UMRP, Aurillac, France

<sup>2</sup> Université Clermont Auvergne, CNRS, Sigma Clermont, ICCF, Clermont-Ferrand, France

<sup>3</sup> Dômes Pharma, Pont-du-Château, France

\* Corresponding author

E-mail: [guillaume.cardin@vetagro-sup.fr](mailto:guillaume.cardin@vetagro-sup.fr) (GC)

Short title: A new methodology to investigate the biological properties of cheese

## Abstract

With the ever-increasing human lifespan, age-related affections have become a public health issue. The health sector is looking for new bioactive compounds to respond to this demand. The unexplored microbial biodiversity and its metabolites represent a major source of innovative bioactive molecules with health potential. Fermented foods, such as raw-milk cheese, have already been investigated for their rich microbial environment, especially for their organoleptic qualities. But studies remain limited regarding their effects on health and few metabolites of microbial origin have been identified. An efficient methodology was developed in this study to investigate the biological effect of raw-milk cheese, combining a chemical fractionation, to isolate the most metabolites from the cheese matrix, and an *in vivo* biological test using *Caenorhabditis elegans*. *C. elegans* was brought into contact with cheese extracts, obtained by means of chemical fractionation, and with freeze-dried whole cheese by supplementing the nematode growth medium. A longevity assay was performed to evaluate the effects of the extracts on the worms. Our results demonstrate the feasibility of the method developed to bring the worms into contact of the cheese extracts. The evaluation of the effects of the extracts on the longevity was possible. Some extracts showed a beneficial effect as extract W70 for example, obtained with water, which increases the mean lifespan by 16 % and extends the longevity by 73 % ( $p < 0.0001$ ).

## Introduction

Between 1981 and 2010, more than 50 % of new drugs were derived from natural products [1]. However, to date, less than 15 % of plant biodiversity [2] and less than 1 % of the microbial biodiversity [3] have been explored. Thus, microorganisms represent a major source of innovative bioactive molecules with health potential. Some microorganisms have already been investigated for their biological properties, as probiotics for example [4,5], and could be of great interest for preventive health applications. Natural compounds, especially from plants, are already being used for age-related affections (for examples cardiovascular diseases [6] or osteoarthritis [7]), that have become a public health issue with the increase in life expectancy. Many biological processes are involved in these affections including inflammation [8] and oxidative stress [9]. Some studies have demonstrated the anti-inflammatory [10] or antioxidative activities [11] of certain specific microorganisms, or of some of their metabolites. The unexplored microbial diversity may be a new source of bioactive compounds, with a



potential beneficial effect against these age-related processes. Fermented foods, such as cheese, have been investigated for their rich microbial environment. This daily food, appreciated in many countries for its taste value, has been the subject of many nutritional [12,13] and sensorial [14,15] studies in an attempt to understand and to improve its organoleptic qualities. Recently, certain biological properties, such as the antimicrobial [16], probiotic [17,18] and anti-inflammatory [19] activities of the bacteria isolated from milk, yogurt or cheese have been studied. However, these studies remain limited and few bioactive metabolites of microbial origin have been identified.

The goal of our study was to develop a methodology to isolate the metabolites from raw-milk cheese by obtaining cheese fractions, before evaluating their biological effect. Two extraction processes were employed to develop an efficient extraction of cheese metabolites. The first one consisted in a fractionation extraction based on the variation of the solvent polarity to remove the most compounds from the cheese matrix. The second process consisted in aqueous extractions, as it has been reported that the polar compounds in cheese possess potent biological properties [20,21]. Moreover, water is considered a green solvent, making the process more environmentally suitable for industrial development if it presents good results. Then the biological effects of the resulting fractions were evaluated using the nematode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) as an *in vivo* model. The similarities in *C. elegans* and human genetics, as well as its short lifespan, make it a reliable experimental model to test the impact of such cheese extracts on the host [22]. Like *Drosophila melanogaster* this worm has become a rudimentary *in vivo* model used to characterise the probiotic properties of bacteria and yeasts [23–25] but its use has now been extended to the screening of the biological effects of plant extracts [26,27]. In this context, we decided to use *C. elegans* to investigate the impact of cheese fractions on the longevity. A method was developed to bring the worms into contact with cheese extracts, as well as with freeze-dried whole cheese, by supplementing the usual nematode growth medium. Then, longevity assays using *C. elegans* were performed to evaluate the biological effects of the cheese extracts and of the whole cheese.

## **Material and methods**

### **Cheese sample**

Goat cheese, ripened for twenty days, (the simplest form made by allowing raw milk to naturally curdle and then draining and pressing the curds) was purchased from a local producer (Chèvrerie des Oliviers, Saint-Georges sur Allier, France), cut into small slices and stored at -

25 °C. Before extraction, the cheese was freeze-dried (FreeZone Triad Freeze Dryer, Labconco corporation, Kansas City, Missouri) and ground with mortar and pestle. The freeze-dried cheese (FDC) was stored at 4 °C in a waterproof container.

## Reagents and solvents

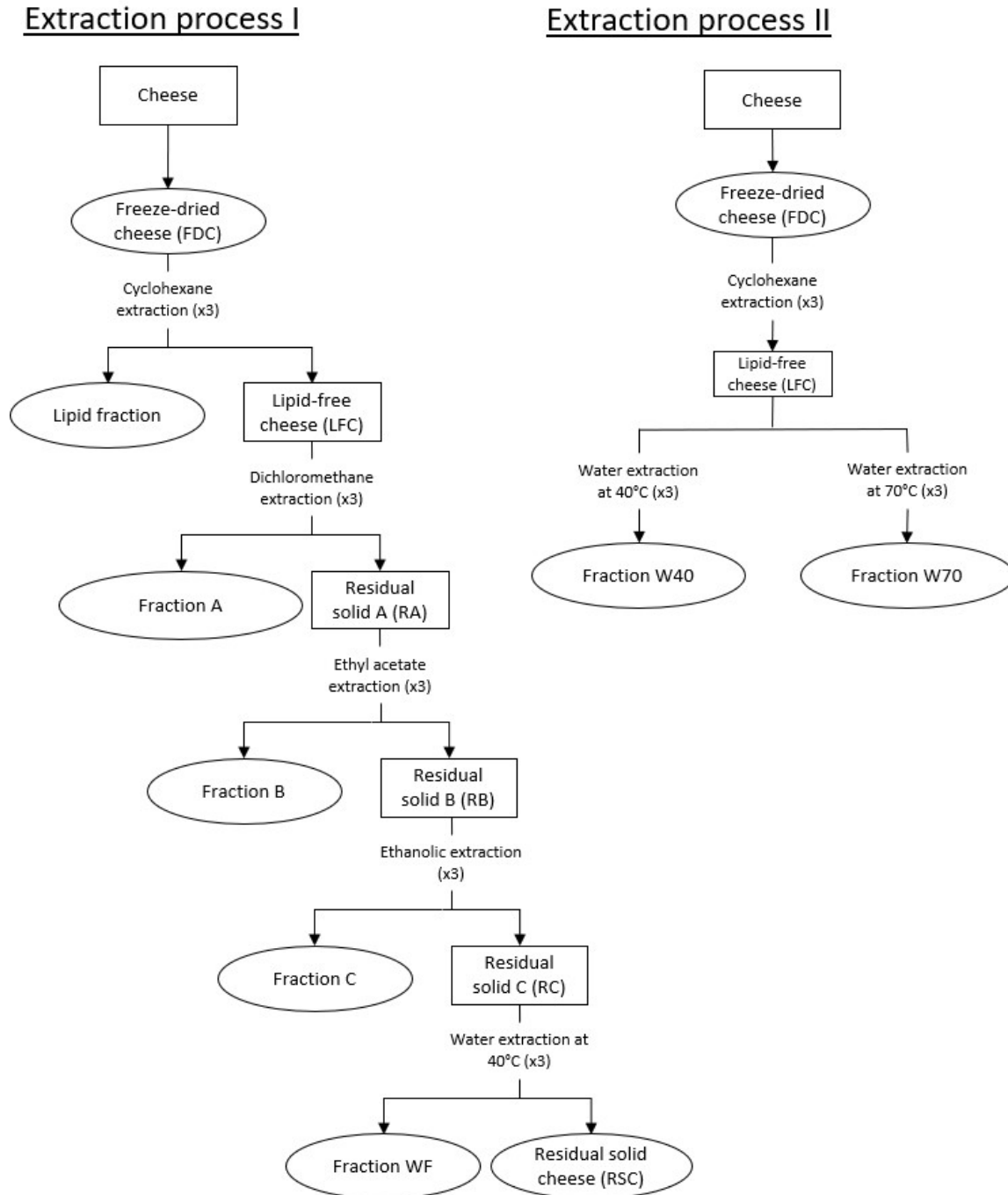
Cyclohexane and dichloromethane were purchased from Carlo Erba (Val de Reuil, France), ethyl acetate and absolute ethanol were purchased from VWR chemicals (Radnor, USA). 5-fluoro-2'-deoxyuridine (FUdR), amphotericin B (250 µg/mL), agarose, cholesterol, NaCl, MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, potassium phosphate buffer and NaOH were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Louis, USA). Lysogeny Broth (LB, Miller's Modification), peptone and agar were purchased from Conda (Madrid, Spain). Yeast extract was purchased from Fisher Scientific (Hampton, USA).

## Cheese extractions: Obtaining cheese fractions

**Cryogenic crushing of freeze-dried cheese.** The freeze-dried cheese (FDC) was crushed using cryogenic grinding. The resulting powder was kept in a waterproof container at -25 °C until use.

A method was developed to extract efficiently metabolites from freeze-dried cheese, based on successive solid/liquid extractions. According to their polarity property, the solvents used were adapted for each extraction performed to remove the metabolites from the cheese matrix. Five different solvents were used to collect cheese metabolites as specified by a polarity scale, from nonpolar to polar (cyclohexane, dichloromethane, ethyl acetate, absolute ethanol and water). To make sure the cheese matrix was exhausted, each solvent extraction was performed three times successively (called separation step 1, 2 or 3 in this study). The yield of each solvent extraction and the separation step was determined. These values were used to quantify the amount of dry extract recovered and to check the efficiency of the exhaustion, by comparing the yield of each separation step for the same solvent.

Extractions were performed on the freeze-dried cheese, starting with cyclohexane (apolar solvent) used to extract lipid fraction. Then two different extraction processes were implemented to remove the metabolites. Extraction process I corresponded to fractional extraction. Extraction process II consisted in water extractions directly on the lipid-free cheese (LFC). The extraction procedures are resumed in the [Fig 1](#).



**Fig. 1: Preparation of cheese fractions.** Rings indicate the cheese extracts used for biological tests (FDC, lipid fraction, fractions A, B, C, WF, W40, W70 and RSC).

**Lipid extraction.** A lipid extraction was performed to recover the apolar fraction of the cheese metabolites. The protocol was adapted from Bligh and Dyer (1959), Folch *et al.* (1957) and Manirakiza *et al.* (2001) [28–30]. Distilled cyclohexane (ratio 1/10 (w/w)) was added to FDC powder under mechanical agitation for 4 h. The resulting mixture was filtered with Büchner, concentrated under vacuum and the residue was dissolved in cyclohexane (ratio 1/10 (w/v)), then filtered again to eliminate the residue of the cheese and again concentrated under

vacuum. The solvent extraction was performed three times under the same conditions at different times (4 h, 2 h and 1 h, respectively) to exhaust the cheese matrix. The resulting dry extracts were combined to obtain the final fraction, named lipid fraction.

**Extraction process I.** A fractional extraction was carried out on the LFC to collect most of the components from the cheese matrix. The procedure resulted in four successive solid/liquid extractions, increasing the polarity of the solvent at each step: dichloromethane, ethyl acetate, absolute ethanol and water.

Extractions were performed on the LFC with dichloromethane, followed with ethyl acetate and ethanol as shown in Fig 1. The protocol used was the same as for the lipid extraction for each solvent, but with a 1/10 (w/v) ratio. The final fractions were named fraction A, B and C, respectively.

An aqueous extraction was performed on the residual solid C (RC). The protocol was adapted from Polychroniadou *et al.* (1999) and Huma *et al.* (2018) [31,32]. The residual solid C (RC) was mixed with HPLC grade water at a ratio of 1/10 (w/v) under mechanical agitation and held at 40 °C for 1 h. After centrifugation (8000 rpm, 15 minutes; Avanti J26S XPI, Beckman Coulter, Brea, USA), the supernatant was concentrated under vacuum, filtered and evaporated before drying under vacuum. The extraction was performed three times under the same conditions to exhaust the cheese matrix. The resulting dry extracts were combined to obtain the final fraction, crushed with mortar and pestle and named fraction WF.

The residual solid cheese (RSC) was finely crushed with mortar and pestle and then by cryogenic grinding.

**Extraction process II.** A process was performed on the LFC, consisting in two extraction conditions with water at two different temperatures (40 °C and 70 °C) (Fig 1). LFC was mixed with HPLC grade water at a ratio of 1/10 (w/v) under mechanical agitation and held at 40 °C (or 70 °C) for 1 h. After centrifugation (8,000 rpm, 15 minutes; Avanti J26S XPI, Beckman Coulter, Brea, USA), the supernatant was concentrated under vacuum, filtered and evaporated before drying under vacuum. The extractions were performed three times under the same conditions, for each temperature, to exhaust the cheese matrix. The resulting dry extracts were combined to obtain the final fractions, crushed with mortar and pestle and named fraction W40 (extraction at 40 °C) or W70 (extraction at 70 °C).

Each fraction was stored at -25 °C under argon in a waterproof container until use.

## **Growth of *Escherichia coli* and heat-killed**

*Escherichia coli* (*E. coli*) OP50 was used to feed the worms during the assay. The strain was provided by the *Caenorhabditis* Genetics Center (Minneapolis, MN, USA) and was grown on Lysogeny Broth medium at 37 °C overnight. Microbial suspensions were pelleted for 15 minutes at 4,000 rpm (Rotofix 32A, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany) and washed with M9 buffer (per L: 3 g of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6 g of Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 g of NaCl, 1 mL of 1 M MgSO<sub>4</sub>) to a final concentration of 100 mg/mL. To obtain heat-killed (HK) *E. coli* (100 mg/mL), the resulting suspension was held 1h in a water bath at 75 °C. The solution was kept at 4 °C until use.

## **Culture of *Caenorhabditis elegans***

The *Caenorhabditis elegans* N2 (wild-type) strain was provided by the *Caenorhabditis* Genetics Center (Minneapolis, MN, USA). The nematodes were grown and maintained at 20 °C on Nematode Growth Medium (NGM) plates (per L: 3 g of NaCl; 2.5 g of peptone; 17 g of agar; 5 mg of cholesterol; 1 mM of CaCl<sub>2</sub>; 1 mM of MgSO<sub>4</sub>, 25 mL of 1 M potassium phosphate buffer at pH 6), supplemented with yeast extract (4 g/L) (NGMY) and seeded with live *E. coli* OP50 [33–35].

## ***Caenorhabditis elegans* synchronization**

The eggs and gravid worms were washed with M9 buffer and centrifuged for 2 minutes at 1,500 rpm. The pellet was resuspended in 5 mL of worm bleach (2.5 mL of M9 buffer, 1.5 mL of bleach, 1 mL of sodium hydroxide 5M) and vigorously shaken until adult worm body disruption. The action of the worm bleach was stopped by adding 40 mL of M9 buffer. The egg suspension was then centrifuged for 2 minutes at 1,500 rpm and washed twice with 20 mL of M9 buffer. The eggs were allowed to hatch under slow agitation at 25 °C for 24 h in 20 mL of M9 buffer. The L1 larvae were settled by centrifugation at 1,500 rpm for 2 minutes and were resuspended in 1 mL of the remaining supernatant. One hundred microliters was then transferred onto NGMY plates, seeded with live *E. coli* OP50, and incubated until the worms reached the L4 / young adult stage [33–35].

## ***Caenorhabditis elegans* lifespan assay**

In order to determine the effect of cheese extracts on the worm longevity, a lifespan assay was performed with the *C. elegans* wild-type strain N2. An agar medium (per L: 3 g of NaCl and 6 g of agarose) was prepared and stored at 55 °C. This medium was adapted from the NGM used for the culture of the *C. elegans* but was depleted as much as possible to avoid any fungal development during the assay. The medium was divided into aliquots and individually supplemented with cheese extracts at the appropriate concentration ([Table 1](#)), before being poured at 40 °C into 24-well plate with 0.12 mM of FUdR. Each extract was introduced into the medium at 0.5% (w/v). Other concentrations were tested according to the nature of the extract, so as not to modify the physicochemical properties of the medium. To avoid any significant fungal development, which was commonly observed when using total cheese and lipid fraction, the medium was supplemented with amphotericin B for a final concentration of 1.6 µg/mL. The presence of the antifungal, or not, established two control conditions: with and without amphotericin B. A comparison was made between the lifespans of the worms in each of the two control conditions to determine whether the antifungal had an influence on nematode longevity. Amphotericin B was chosen because of its broad spectrum of action and because it does not have a toxic effect on *C. elegans* [36,37]. After pouring, the wells were immediately transferred onto ice, to solidify the agar, and stored at 4 °C until being use. The synchronous L4 worms were incubated on a supplemented agar medium (or agar medium for the control condition) with ~20 worms per well. They were fed with HK *E. coli* OP50 and kept at 20 °C for the duration of the experiment. The wells were supplemented with food every 3 days to avoid starvation (20 µL of 100 mg/mL suspension). Day 0 corresponded to the first day when the worms were incubated on the medium. Live worms were scored each day until the death of all of the nematodes. A worm was scored as dead when it did not respond to a gentle mechanical stimulation. The total cheese and cyclohexane extract conditions were compared to the control condition with amphotericin B and food (CC2) whereas the other conditions were compared to the control condition with food only (CC1). This assay was performed as four independent experiments with three wells per condition and conducted side by side with the control conditions [38,39].

**Table 1 : Concentration of the different cheese extracts used for supplementing the medium.**

Fractions	Concentration (w/v)			
	0.1 %	0.5 %	1 %	2 %
Freeze-dried cheese (FDC)		X		
Lipid fraction	X	X		
Fraction A		X		
Fraction B		X		
Fraction C	X	X		
Fraction WF (40 °C)		X	X	X
Residual Solid Cheese (RSC)		X		
Fraction W40 (40 °C)		X	X	X
Fraction W70 (70 °C)		X	X	X

Concentrations are expressed in percentage of extracts relative to the volume of medium.

## Statistical analysis

The data of the *C. elegans* survival assay were analysed using the Kaplan-Meier method, and differences were determined using the log-rank test with R software version 1.1.463. Differences were considered statistically significant if p-value  $\leq 0.05$ . Conditions were compared to their respective control. Moreover, when it was possible, conditions at the same concentration were compared and the different concentrations of the same fraction were also compared.

## Results

### Development of the chemical extraction process

The goal was to develop a method of obtaining cheese fractions in order to investigate their biological capacities. As the composition of the cheese matrix was not fully described, we envisaged two extraction processes in order to extract most of compounds. Extraction process

I consisted in successive extractions, increasing polarity solvents in order to remove the most compounds. Extraction process II consisted in removing the lipid fraction before performing two water extractions at two different temperatures (40 °C and 70 °C). For each solvent, extraction was performed three times to exhaust the cheese matrix and recover the most components. The Residual Solid Cheese (RSC) was also recovered at the end of the Extraction process I and represented 24.5 % of the initial freeze-dried cheese (FDC) engaged. After each separation step, the yield of the dry extract was calculated. A comparison was made between the yields of each separation step for the same solvent in order to evaluate the efficiency of the different extractions ([Table 2](#) for Extraction process I, [Table 3](#) for Extraction process II). For most solvents, more than 60 % of the final extract was recovered during separation step 1 (45.9 % of the final yield of 47.9 % in the case of the lipid fraction). These values were clearly higher than the yields of separation steps 2 and 3 involving the same solvent. For example, a yield of 45.9 % was calculated for the lipid fraction in separation step 1, whereas yields for separation steps 2 and 3 were 1.9 % and 0.1 %, respectively. The significant differences in yields between the successive separation steps demonstrated the efficiency of the developed method to exhaust the cheese matrix and to recover the most compounds.

**Table 2: Yields from Extraction process I in percentage (lipid fraction and fractions A, B, C and WF).**

Fractions	Yields (%)			
	separation step 1	separation step 2	separation step 3	Final fraction
<b>Lipids</b>	45.9	1.9	0.1	47.9
<b>A</b>	1.3	0.2	0.1	1.6
<b>B</b>	0.08	0.03	0.01	0.12
<b>C</b>	0.9	0.5	0.4	1.8
<b>WF (40 °C)</b>	13.1	4.9	3.0	21.0

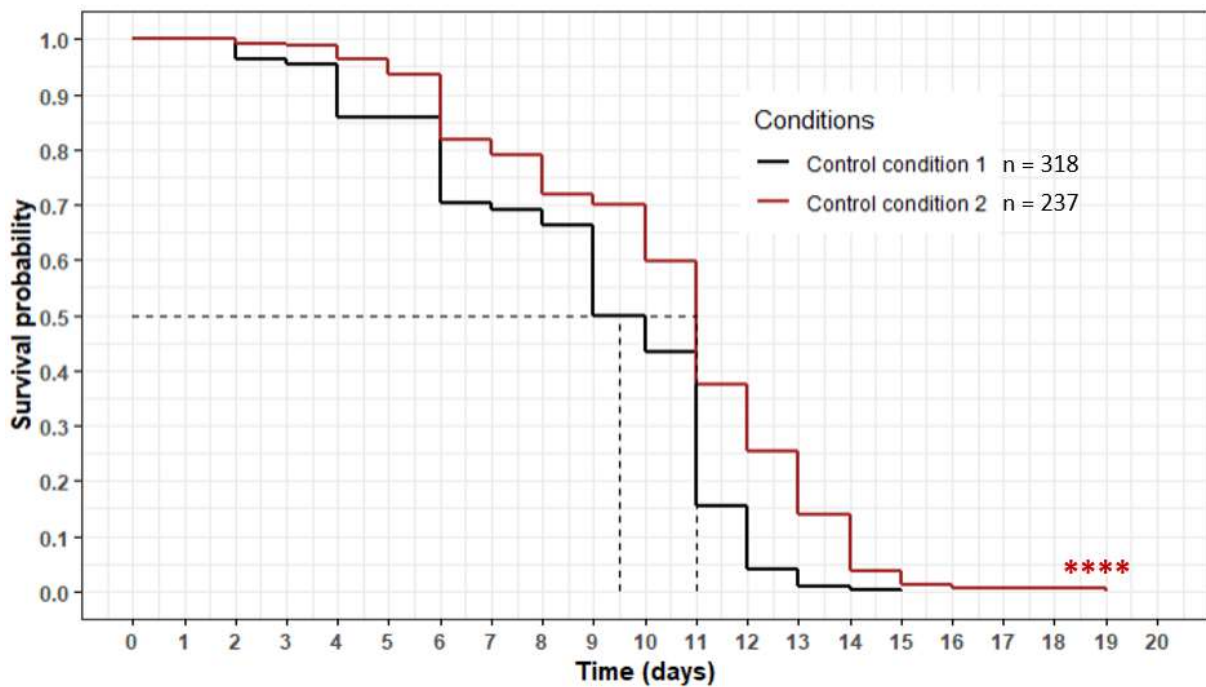


**Table 3: Yields from Extraction process II in percentage (Fractions W40 and W70).**

Fractions	Yields (%)			
	separation step 1	separation step 2	separation step 3	Final fraction
W40 (40 °C)	15.8	4.7	1.2	21.7
W70 (70 °C)	16.2	2.4	0.5	19.0

### Effects of the antifungal on the nematode lifespan

During the supplementation of the medium, an antifungal, amphotericin B, was added with the FDC and lipid fraction to avoid any significant fungal development that would hinder the ability to count the worms. A specific control condition with amphotericin B (CC2) was prepared to evaluate the effects of the antifungal on the nematode lifespan. To evaluate the effects of the antifungal, the relative position and the evolution of the survival curve of CC2 was compared with the control condition without antifungal CC1 curve (Fig. 2).



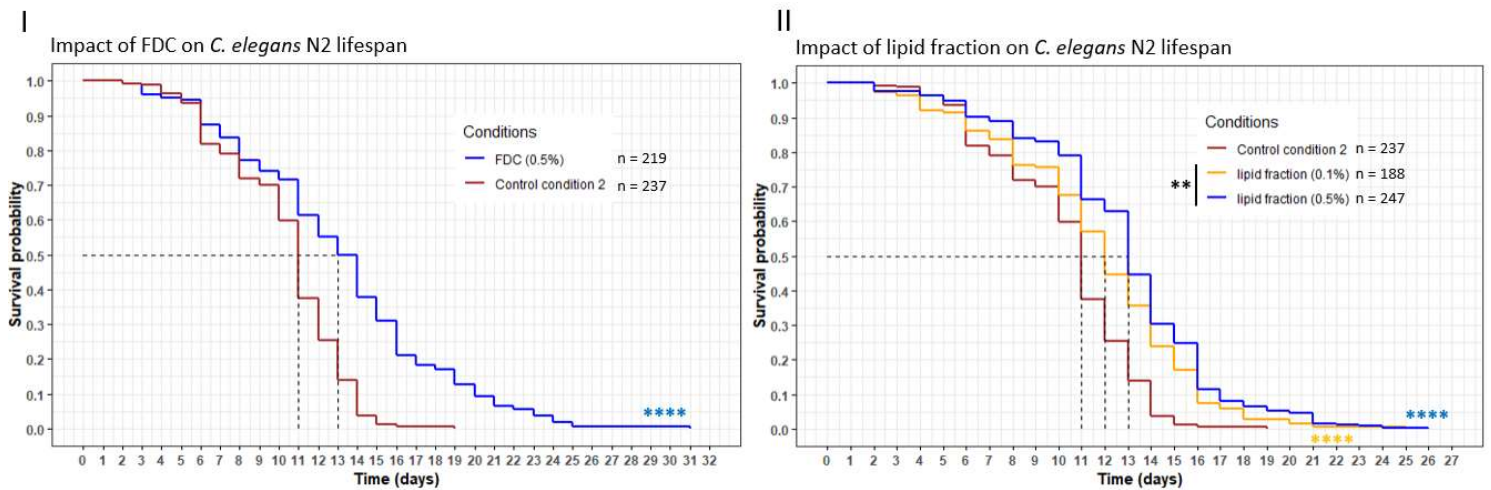
**Fig 2: Influence of Amphotericin B on *C. elegans* wild-type N2 strain lifespan.** Comparison between CC1 and CC2. Worms were incubated on the medium (with or without antifungal) at

day 0 and fed every three days with HK OP50. The asterisks indicate the  $p$ -values (log-rank test) (“\*”:  $p < 0.05$ ; “\*\*”:  $p < 0.01$ ; “\*\*\*”:  $p < 0.001$ ; “\*\*\*\*”:  $p < 0.0001$ )

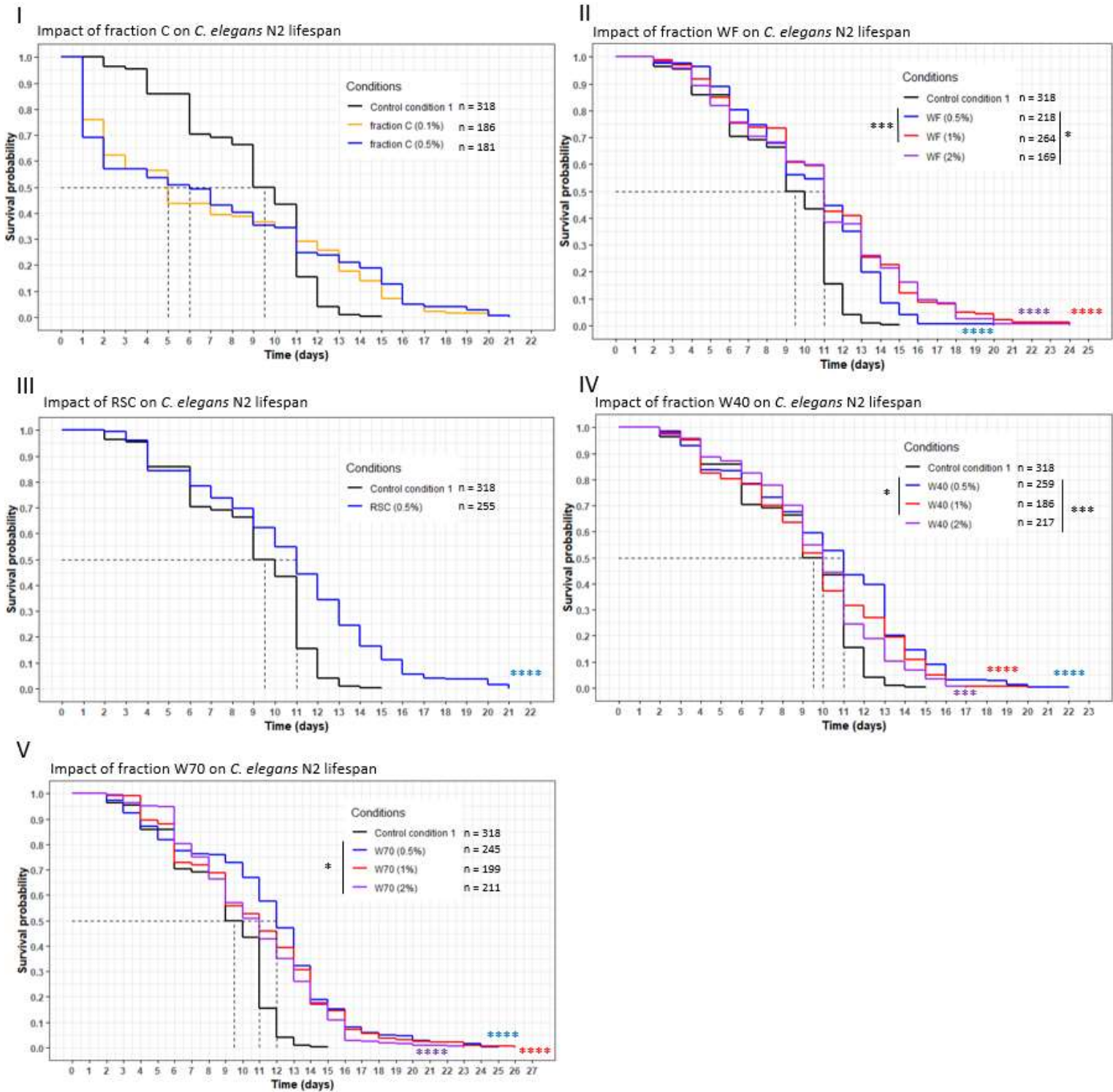
We observed that the CC2 curve was significantly above CC1 curve ( $p$ -value  $< 0.0001$ ). The mean and maximum lifespan were significantly higher for CC2 (11 and 19 days, respectively) than for CC1 (9.5 and 15 days, respectively) ( $p < 0.0001$ ). These results demonstrated the impact of the antifungal on the nematode lifespan, justifying the use of a control with antifungal to evaluate the effect of the FDC and lipid fractions on longevity.

### Cheese extracts influenced the lifespan of *C. elegans*

The goal was to investigate the effect of cheese fractions on *C. elegans* longevity with a lifespan assay (Figs 3 and 4). Complementary information was taken into account when evaluating the effects of cheese fractions and whole cheese: a comparison between the relative position of the curves and their evolution, the mean and maximum lifespan and the percentage of the population still alive on cheese conditions when the worms of the control condition were all dead (Tables 4 and 5).



**Fig 3: Influence of FDC and lipid fractions on *C. elegans* wild-type N2 strain lifespan.** Worms were incubated on fractions at day 0 and fed every three days with HK OP50. The asterisks indicate the  $p$ -values (log-rank test) (“\*”:  $p < 0.05$ ; “\*\*”:  $p < 0.01$ ; “\*\*\*”:  $p < 0.001$ ; “\*\*\*\*”:  $p < 0.0001$ ). The asterisks around the curves are the comparisons with the control conditions. The asterisks around the legend are the comparisons between the fractions.



**Fig 4: Influence of fractions E, WF, W40, W70 and RSC on *C. elegans* wild-type N2 strain lifespan.** Worms were incubated on fractions at day 0 and fed every three days with OP50 HK. The asterisks indicate the p-values (log-rank test) (“\*”:  $p < 0.05$ ; “\*\*”:  $p < 0.01$ ; “\*\*\*”:  $p < 0.001$ ; “\*\*\*\*”:  $p < 0.0001$ ). The asterisks around the curves are the comparisons with the control conditions. The asterisks around the legend are the comparisons between the fractions.

**Table 4: Survival of *C. elegans* fed with FDC and lipid fractions and CC2 as a control.**

<b>Tested conditions</b>	<b>Concentration (w/v) (%)</b>	<b>Mean lifespan (days)</b>	<b>Maximum longevity (days)</b>	<b>Percentage of population alive at 19 days (%)</b>	<b><i>p</i>-value</b>
<b>Freeze-dried cheese (FDC)</b>	0.5	13	31	13	< 0.0001
<b>Lipid fraction</b>	0.1	12	25	3	< 0.0001
	0.5	13	26	5	< 0.0001
<b>CC2</b>	-	11	19	0	-

Mean lifespan, maximum longevity and the percentage of population alive are from survival curves. *p*-values were calculated by comparing conditions with CC2 using the log-rank test.

**Table 5: Survival of *C. elegans* fed with fractions C, WF, W40, W70 and RSC and CC1 as a control.**

<b>Tested conditions</b>	<b>Concentration (w/v) (%)</b>	<b>Mean lifespan (days)</b>	<b>Maximum longevity (days)</b>	<b>Percentage of population alive at 15 days (%)</b>	<b><i>p</i>-value</b>
<b>Fraction C</b>	0.1	5	20	8	0.4
	0.5	6	21	13	0.5
<b>Fraction WF (40 °C)</b>	0.5	11	20	5	< 0.0001
	1	11	24	12	< 0.0001
	2	11	24	16	< 0.0001
<b>Residual Solid Cheese (RSC)</b>	0.5	11	21	11	< 0.0001
<b>Fraction W40 (40 °C)</b>	0.5	11	22	10	< 0.0001
	1	10	20	5	< 0.0001
	2	10	17	4	0.0004
<b>Fraction W70 (70 °C)</b>	0.5	12	25	15	< 0.0001
	1	11	26	14	< 0.0001
	2	11	23	11	< 0.0001
<b>CC1</b>	-	9.5	15	0	-

Mean lifespan, maximum longevity and the percentage of population are from survival curves. *p*-values were calculated by comparing conditions with CC1 using the log-rank test.

Incubating worms with freeze-dried cheese (FDC) resulted in a significant increase in the longevity compared to the control condition CC2 ( $p$ -value  $<0.0001$ , [Fig 3I](#)), with the FDC curve above the CC2 curve all along the assay and a mean lifespan changing from 11 to 13 days (+ 18 %). Another important observation was that 13 % of the worm population on FDC supplemented medium were still alive at 19 days (maximum lifespan of the worms of CC2) and stayed alive until 31 days (+ 63 %) ([Table 4](#)). The same observations were made with the worms incubated with the lipid fraction ([Fig 3II](#)). Curves of the lipid fraction were above the CC2 curve all along the assay with a significant difference ( $p$ -values  $<0.0001$  for both concentrations). The mean lifespan increased from 11 to 12 days (+ 9 %) (0.1 % w/v) or 11 to 13 days (+ 18 %) (0.5 % w/v). A small proportion of the population on the medium supplemented with the lipid fraction was still alive at 19 days (5 % maximum) and stayed alive until 26 days (+ 37 %). A dose-response was also observed for the lipid fraction with the curve for 0.5 % concentration significantly above the curve of 0.1 % concentration ( $p = 0.006$ ). FDC and lipid fraction showed a beneficial effect on the nematode lifespan. The difference with CC2 was significant, meaning the effect was not due to the antifungal added to the medium.

Fractions A and B killed the worms immediately after incubating them on the supplemented medium. Consequently, no data could be presented for these two conditions.

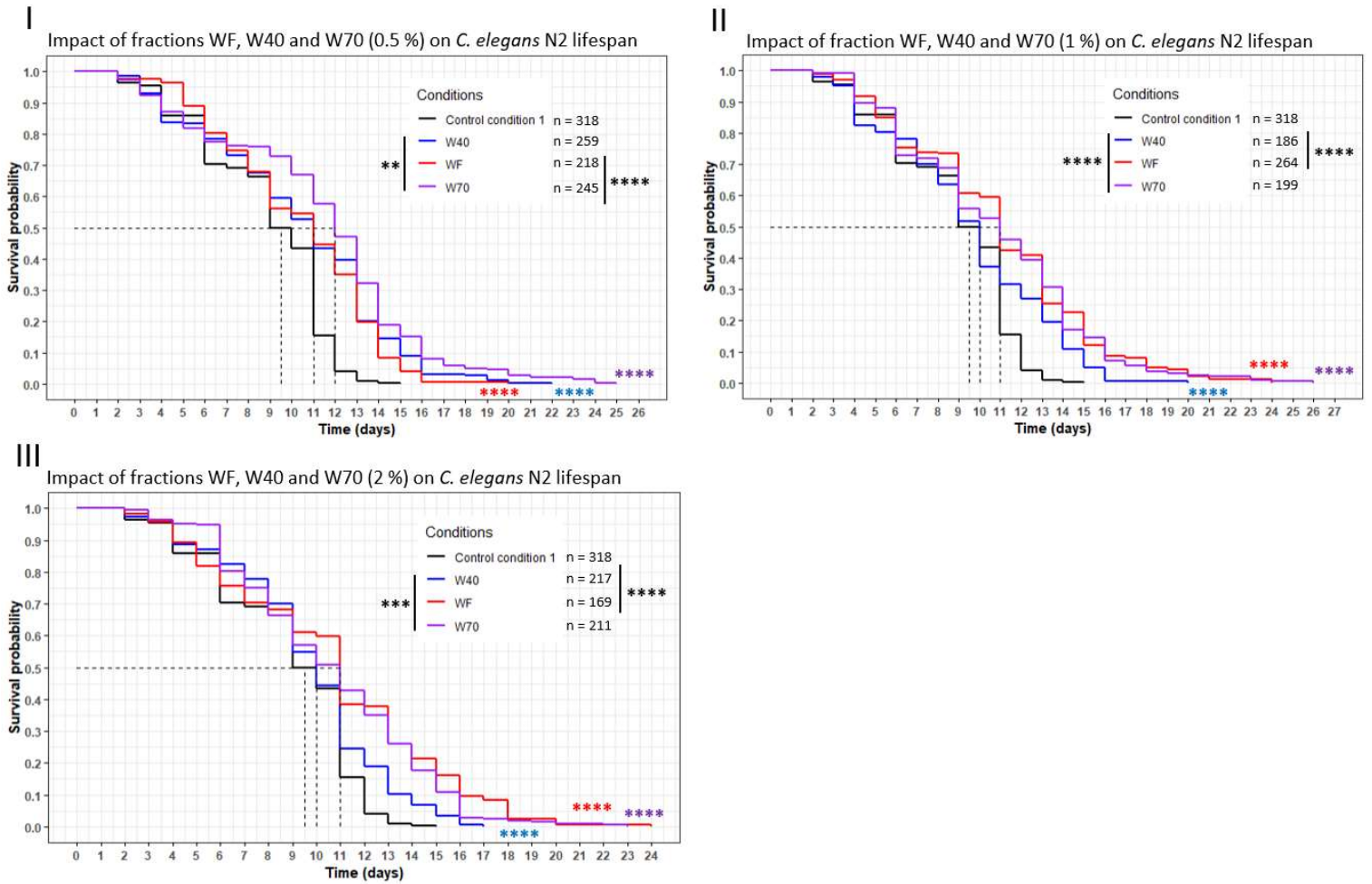
The survival of the worms incubated on fraction C presented a two-phase variation during the assay. In the first days, an important decrease in the population was observed ([Fig 4I](#)), with curves below the CC1 curve for both concentrations. This resulted in a mean lifespan lower than CC1 by 47 % (at 0.1 %) and 37 % (at 0.5 %) ([Table 5](#)). However, a few days after this initial decrease, an increase in the lifespan, to a maximum of 21 days, became apparent, and up to 13 % of the population was still alive whereas the control condition died at 15 days. After killing half of the population within the first few days, the fraction C induced a beneficial effect from then on.

Incubating worms on fraction WF, W40, W70 or Residual Solid Cheese (RSC) also resulted in an extended longevity. Each concentration of these fractions significantly increased the mean lifespan compared to CC1 ( $p$ -value  $<0.0001$ ) with the curves of the fractions above the CC1 curve ([Fig 4II-4V](#)). The mean lifespan increased between 5 % and 26 %, with the most important variation observed for W70 at 1 % w/v ([Table 5](#)): the mean lifespan changed from 9.5 to 12 days. Longevity rose in all conditions, with a minimum increase of 13 %, to a maximum increase of 73 %, with W70 at 1 % showing the best variation, going from 15 (CC1) to 26 days. Moreover, the worm populations incubated on these fractions were all still alive at

15 days, with up to 16 % alive for WF at a concentration of 2 %. For fractions WF, W40 and W70 a dose-response was observed. In general, there was a significant difference between the W40 curve at 0.5 % and the curves of the other concentrations ( $p = 0.02$  with 1 %,  $p = 0.0004$  with 2 %), whereas for the same concentration of WF, the curve was significantly below the others ( $p = 0.003$  with 1 %,  $p = 0.02$  with 2 %). A significant difference was only observed for W70 between 0.5 % and 2 %, with the 0.5 % concentration curve above the 2 % concentration curve ( $p = 0.01$ ). In sum, the beneficial impact of these fractions was shown by the increase in the longevity of the worms compared to that of the CC1 worms.

## **Impact of the extraction conditions of the fractions prepared with water on worm lifespan**

Three different fractions were obtained with water extraction: WF from the Extraction process I, W40 and W70 from the Extraction process II. The worms were exposed to different concentrations (0.5, 1 and 2 %) ([Fig 5](#)) of these fractions. At the 0.5 % concentration, W70 showed the highest effect, with the curve significantly above the WF and W40 ones ( $p = 0.002$  with W40;  $p < 0.0001$  with WF). The mean lifespan and maximum longevity were the highest for the fraction W70 at this concentration ([Table 5](#)). At the 1 % and 2 % concentrations, the survival curve of W40 was significantly below the WF ( $p = 0.0009$  at 1 %;  $p = 0.0004$  at 2 %) and the W70 ( $p < 0.0001$  for both concentration) curves. In both concentrations, the increase in mean lifespan and maximum longevity was lower for W40 (+5 % and up to +33 %, respectively) than for the other fractions (+16 % and at least +53 %, respectively). The nematodes did not show the same biological response to the fraction WF, W40 and W70, suggesting a variation in their composition.



**Fig 5: Comparison of the effect of aqueous fractions WF, W40 and W70 on *C. elegans* wild-type N2 strain lifespan.** Worms were incubated on aqueous fractions at day 0 and fed every three days with OP50 HK. The asterisks indicate the p-values (log-rank test) (“\*”:  $p < 0.05$ ; “\*\*\*”:  $p < 0.01$ ; “\*\*\*\*\*”:  $p < 0.0001$ ). The asterisks around the curves are the comparisons with the control conditions. The asterisks around the legend are the comparisons between the fractions.

## Discussion

### Determination of the optimal parameters to perform the longevity assay on the worms

To investigate the effects of cheese extracts on the nematode lifespan, we had to develop a method of bringing the worms into contact with them. Recent studies have demonstrated the possibility of providing the worms with plant extracts through two different methods. The first method consists in adding the extract to a liquid medium either in its solid form or dissolved in a solvent [26,27,40]. In some case, solvents such as Dimethyl sulfoxide (DMSO), were added to the medium to dissolve the plant extract. However, their possible toxic effects on the

nematode are a concern, as reported by Wang *et al.* (2010) and Katiki *et al.* (2011) [27,41], who observed a dose-effect reduction in longevity. A second method has been developed to supply the plant extracts by means of a less toxic solvent. Fan *et al.* (2011) and Wiegant *et al.* (2009) [38,39] supplemented the NGM agar plates directly before incubating the worms. We adapted this second supplementation method to supply the worms with the cheese extracts in a homogeneous way. Preliminary trials were done with the NGM used for the culture of *C. elegans*. However, supplementing this medium with freeze-dried Cheese (FDC) and/or fractions resulted in a significant fungal development due to the microorganisms found in cheese and, thus, in some of the extracts, such as the lipid fraction. These microorganisms were not killed during the chemical extraction and proliferated in the medium during the lifespan assay, preventing us from visualising and determining the number of live worms. To solve this problem, the initial medium was depleted as much as possible. The cheese extracts were then added to the agar medium and homogenized before being poured in the wells. This modification limited the fungal development except in the FDC and the lipid fraction. In the case of these extracts, the microorganisms were still present and growing. To thwart this critical point, amphotericin B was added to avoid any significant fungal development. Breger *et al.* (2007) [36] and Huang *et al.* (2014) [37] demonstrated that this antifungal did not have a toxic effect on the nematode. However, this antifungal may have had a positive impact on the lifespan of *C. elegans*. Therefore, two control conditions were studied and compared, CC1 (without antifungal) and CC2 (with antifungal). The assay demonstrated a significant difference between the survival curves as shown in [Fig 2](#). The antifungal tended to increase the longevity of *C. elegans* significantly, suggesting another source of nutrients through carbon intake via the amphotericin B. Consequently, to take into account the presence of the antifungal in the medium, the FDC and the lipid fraction were compared with the CC2.

Another parameter had to be considered to evaluate the effects of the extracts on the longevity. Indeed, the age of the worms, when incubated on the medium, has a notable impact on the results. So, to avoid this age effect, longevity studies were performed with L4 synchronized worms. Once the worms were incubated on supplemented medium, food was placed on the medium. The development of this method allowed for an efficient measure of the effects of the cheese extracts on the nematode lifespan.

In our experiment, the worms were fed their usual diet of *E. coli* OP50 because this customary food could not be replaced by the cheese extracts. To avoid any potential interaction between the bacterial food of the worms, *E. coli* OP50, and the cheese extracts, the bacteria



were heat-killed before being given to the worms. This was done to ensure that the live bacteria could not consume the cheese metabolites or produce compounds in response to their presence, changing the biological effect of the cheese extracts. Killing the bacteria did not have any influence on the lifespan of the worms compared to the live bacteria, as demonstrated by Couillault and Ewbank (2002) [42]. This strategy, to use heat killed OP50, allowed for an efficient measure of the biological effects of the fractions on the longevity.

## **Beneficial effects of cheese fractions on *C. elegans* lifespan**

Our results demonstrated that the extracts exhibited different impacts on worm longevity. The fractions A and B contained compounds that had a negative impact on *C. elegans*. The fractions instantly killed the worms upon incubating them on the medium.

The fraction C, obtained with ethanol, engendered a two-phase reaction during the longevity assay. During the first days of the assay the fraction killed most of worms. However, after three days, it appeared to reinforce the surviving worms by extending their longevity. As the solvent was evaporated, these results allowed two hypotheses to be put forward: the fraction must have contained toxic compounds in low concentration which harmed and killed the worms. Once the concentration decreased, the beneficial effects of the metabolites took over and increased the longevity of the surviving worms. The second hypothesis was that toxic compounds were not necessarily in low concentration, but the worms adapted, resulting in an improved longevity after a few days. As this drastic decrease in the survival curve at the beginning of the assay was not observed for the other fractions, the compounds with a negative impact might be specific to this fraction and, consequently, could be extracted with ethanol alone.

All of the other fractions demonstrated a beneficial effect on the nematode lifespan. Concerning the freeze-dried cheese (FDC) and the lipid fraction, the comparisons were carried out with the CC2, to take into account the presence of the antifungal in the medium. As they significantly increased the lifespan of the worms compared to the CC2 ( $p < 0.0001$  for both fractions), this observation showed that the beneficial effects cannot be attributed to the antifungal alone, but to the presence of the extracts themselves. The fractions WF, W40, W70 and Residual Solid Cheese (RSC) presented an increased lifespan compared to the CC1 ( $p = 0.0004$  for W40 at 2%,  $p < 0.0001$  for other conditions). In some cases, a dose-response could be observed, with differences between the concentrations for WF, W40 and W70. The different

effects observed suggest that they could be correlated with the composition of the fractions. Further chemical analyses and genetic studies are necessary to investigate the nature of the compounds and the signalling pathways involved in the differences on *C. elegans* lifespan.

All these results validated, as evidenced by the variations of the biological responses of the worms, that the medium supplementation was efficient with every fraction. This study showed that *C. elegans* was a pertinent model for screening the effects of cheese extracts on the longevity. In fact, most fractions were able to increase the longevity significantly in comparison with their respective control condition, with a dose-response in some cases. The next step in this methodology would be to study the mechanism of action of the fractions by using nematodes mutants. Some signalling pathways have already been described to be involved in the mechanism of the longevity [35,40] and could represent a new study target.

## **Comparison of the effects of extracts WF, W40 and W70 on nematode longevity**

As discussed above, the longevity assay demonstrated the beneficial effects of the extracts WF, W40 and W70 on the worms. Each extract increased the longevity of the worms significantly compared to the CC1. Another result given by the assay was the difference in their biological effect when introduced into the same concentration. At 1% and 2%, the extract W40 presented the lowest effect, as its curve was significantly below the two other extracts. Concerning the 0.5% concentration, W70 showed the highest effect compared to the other two extracts. The extracts prepared with water exhibited a beneficial effect on worm longevity. The variations in the responses of the worms may be correlated with the variations induced by the extraction conditions, in the composition of the extracts. Further chemical analyses are needed to investigate and validate this hypothesis. All these results demonstrated that the Extraction process II was an efficient process to obtain extracts with a beneficial effect on longevity. Indeed, the extracts were easier to obtain using 2-step solvent extractions in comparison with the Extraction process I. Moreover, the Extraction process II was performed using water, essentially, which is a most suitable solvent for industrial development and applications of using cheese fractions for their health benefits.

Comparing the biological effects of different extracts prepared with the same solvent was made possible thanks to *C. elegans*, thereby classifying this nematode as an efficient *in vivo* model. Thus, the methodology developed in this work will be used for a bioguided approach for the screening of the biological properties of different extracts.

## Conclusion

This study allowed the development of a methodology to isolate the metabolites from the cheese matrix and to evaluate the biological effect of the extracts using an *in vivo* test. This work validated the method of bringing the worms into contact with the cheese extracts. We demonstrated that fermented foods, especially raw-milk cheese, could promote a beneficial effect on the *C. elegans* longevity. The results confirmed the beneficial role of some cheese extracts (FDC, RSC, WF, W40, W70 and lipid fraction), in increasing the mean and maximum lifespan of the worms. In order to deepen their characterisation, the determination of the chemical composition of extracts and the identification of the biological mechanisms involved in their effects will be the objective of further investigations. The methodology developed in this study could be used for further biological studies or could be applied to other fermented foods.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Guillaume Cardin, Pierre Chalard, Stéphanie Bornes, Laurent Rios.

**Data curation:** Guillaume Cardin.

**Formal analysis:** Guillaume Cardin.

**Investigation:** Guillaume Cardin, Cyril Poupet, Muriel Bonnet, Philippe Veisseire.

**Methodology:** Guillaume Cardin, Isabelle Ripoche, Cyril Poupet, Muriel Bonnet, Philippe Veisseire, Pierre Chalard, Stéphanie Bornes, Laurent Rios.

**Supervision:** Pierre Chalard, Anne Chauder, Etienne Saunier, Julien Priam, Stéphanie Bornes, Laurent Rios.

**Validation:** Isabelle Ripoche, Pierre Chalard, Stéphanie Bornes, Laurent Rios.

**Writing – original draft:** Guillaume Cardin.

**Writing – review & editing:** Isabelle Ripoche, Cyril Poupet, Muriel Bonnet, Philippe Veisseire, Pierre Chalard, Julien Priam, Stéphanie Bornes, Laurent Rios.

**Funding:** This work was supported by VetAgro Sup by way of grants to GC. Dômes Pharma provided support in the form of salaries for authors AC, ES and JP. Dômes Pharma also contributed by providing research materials for this study. Some strains were provided by the CGC, which is funded by NIH Office of Research Infrastructure Program (P40 OD010440). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The specific roles of these authors are articulated in the ‘author contributions’ section.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within this manuscript.

**Competing interests:** The authors have read the journal's policies and the authors have the following competing interests: AC, ES and JP are paid employees of Dômes Pharma. Dômes Pharma also provided support in the form of research materials for this study. There are no patents, products in development or marketed products associated with this research to declare. This does not alter our adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials.

## References

1. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod*. 2012;75(3):311–35.
2. Fabricant DS, Farnsworth NR. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ Health Perspect*. 2001;109(SUPPL. 1):69–75.
3. Pace NR. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* (80- ). 1997;276(5313):734–40.
4. Kekkonen RA, Lummela N, Karjalainen H, Latvala S, Tynkkynen S, Järvenpää S, et al. Probiotic intervention has strain-specific anti-inflammatory effects in healthy adults. *World J Gastroenterol*. 2008;14(13):2029–36.
5. Peña JA, Rogers AB, Ge Z, Ng V, Li SY, Fox JG, et al. Probiotic *Lactobacillus* spp. Diminish *Helicobacter hepaticus*-Induced Inflammatory Bowel Disease in Interleukin-10-Deficient Mice. *Infect Immun*. 2005;73(2):912–20.
6. Sedighi M, Bahmani M, Asgary S, Beyranvand F, Rafieian-Kopaei M. A review of plant-based compounds and medicinal plants effective on atherosclerosis. *J Res Med Sci*. 2017;22(1):1–24.
7. Akhzari M, Mirghiasi S M. The Effect of *Citrullus colocynthis* on the Reduction of Inflammatory Agents in Osteoarthritis. *Mol Biol*. 2015;04(04).
8. Guarnier V, Rubio-Ruiz ME. Low-grade systemic inflammation connects aging, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Interdisciplinary Topics in Gerontology*. 2015;40:99–106 p.
9. Junqueira VBC, Barros SBM, Chan SS, Rodrigues L, Giavarotti L, Abud RL, et al. Aging and oxidative stress. *Mol Aspects Med*. 2004;25(1–2):5–16.
10. Le Maréchal C, Peton V, Plé C, Vroland C, Jardin J, Briard-Bion V, et al. Surface proteins of *Propionibacterium freudenreichii* are involved in its anti-inflammatory properties. *J Proteomics* [Internet]. 2015;113:447–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2014.07.018>
11. Abdhul K, Ganesh M, Shanmughapriya S, Kanagavel M, Anbarasu K, Natarajaseenivasan K. Antioxidant activity of exopolysaccharide from probiotic strain *Enterococcus faecium* (BDU7) from Ngari. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2014;70:450–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.07.026>
12. Lucas A, Rock E, Chamba J-F, Verdier-Metz I, Brachet P, Coulon J-B. Respective effects of milk composition and the cheese-making process on cheese compositional variability in components of nutritional interest. *Lait* 86. 2006;21–41.
13. Teply LJ, Derse PH, Price W V. Composition and Nutritive Value of Cheese Produced from Milk Treated with Hydrogen Peroxide and Catalase. *J Dairy Sci*. 1958;41(5):593–605.
14. Buchin S, Delague V, Duboz G, Berdague JL, Beuvier E, Pochet S, et al. Influence of Pasteurization and Fat Composition of Milk on the Volatile Compounds and Flavor

- Characteristics of a Semi-hard Cheese. J Dairy Sci [Internet]. 1998;81(12):3097–108. Available from: [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75874-6](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75874-6)
15. Panseri S, Giani I, Mentasti T, Bellagamba F, Caprino F, Moretti VM. Determination of flavour compounds in a mountain cheese by headspace sorptive extraction-thermal desorption-capillary gas chromatography-mass spectrometry. LWT - Food Sci Technol. 2008;41(2):185–92.
  16. Yang E, Fan L, Jiang Y, Doucette C, Fillmore S. Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. AMB Express. 2012;2(1):1–12.
  17. Tambekar D, Bhutada S, Choudhary S, Khond M. Assessment of potential probiotic bacteria isolated from milk of domestic animals. J Appl Biosci. 2009;15:815–9.
  18. Uroić K, Nikolić M, Kos B, Pavunc AL, Beganović J, Lukić J, et al. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from croatian fresh soft cheese and serbian white pickled cheese. Food Technol Biotechnol. 2014;52(2):232–41.
  19. Rocha CS, Lakhdari O, Blottière HM, Blugeon S, Sokol H, Bermúdez-Humarán LG, et al. Anti-inflammatory properties of dairy lactobacilli. Inflamm Bowel Dis. 2012;18(4):657–66.
  20. Saito T, Nakamura T, Kitazawa H, Kawai Y, Itoh T. Isolation and Structural Analysis of Antihypertensive Peptides That Exist Naturally in Gouda Cheese. J Dairy Sci [Internet]. 2010;83(7):1434–40. Available from: [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75013-2](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75013-2)
  21. Meira SMM, Daroit DJ, Helfer VE, Corrêa APF, Segalin J, Carro S, et al. Bioactive peptides in water-soluble extracts of ovine cheeses from Southern Brazil and Uruguay. Food Res Int [Internet]. 2012;48(1):322–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.05.009>
  22. Lee J, Yun HS, Cho KW, Oh S, Kim SH, Chun T, et al. Evaluation of probiotic characteristics of newly isolated *Lactobacillus* spp.: Immune modulation and longevity. Int J Food Microbiol [Internet]. 2011;148(2):80–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.05.003>
  23. 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.
  24. Azat R, Liu Y, Li W, Kayir A, Lin D, Zhou W, et al. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented Winjiang cheese. J Zhejiang Univ B. 2016;17(8):597–609.
  25. Veisseire P, Bonnet M, Saraoui T, Poupet C, Camar 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;8:1–16.
  26. Yu Y-B, Dosanjh L, Lao L, Tan M, Shim BS, Luo Y. *Cinnamomum cassia* bark in two herbal formulas increases life span in *Caenorhabditis elegans* via insulin signaling and stress response pathways. PLoS One. 2010;5(2).
  27. Katiki LM, Ferreira JFS, Zajac AM, Masler C, Lindsay DS, Chagas ACS, et al. *Caenorhabditis elegans* as a model to screen plant extracts and compounds as natural anthelmintics for veterinary use. Vet Parasitol [Internet]. 2011;182(2–4):264–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.020>
  28. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J

- Biochem Physiol. 1959;37(8):911–7.
29. Folch J, Lees M, Sloane Stanley G. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem.* 1957;226:497–509.
  30. Manirakiza P, Covaci A, Schepens P. Comparative Study on Total Lipid Determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and Modified Bligh & Dyer Extraction Methods. *J Food Compos Anal.* 2001;14(1):93–100.
  31. Polychroniadou A, Michaelidou A, Paschaloudis N. Effect of time, temperature and extraction method on the trichloroacetic acid-soluble nitrogen of cheese. *Int Dairy J.* 1999;9(8):559–68.
  32. Huma N, Rafiq S, Sameen A, Pasha I, Khan MI. Antioxidant potential of buffalo and cow milk Cheddar cheeses to tackle human colon adenocarcinoma (Caco-2) cells. *Asian-Australasian J Anim Sci.* 2018;31(2):287–92.
  33. Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 1974;71–94.
  34. Porta-de-la-Riva M, Fontrodona L, Villanueva A, Cerón J. Basic *Caenorhabditis elegans* methods: Synchronization and observation. *J Vis Exp.* 2012;(64):1–9.
  35. 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 preclinical models : First mechanistic insights. *PLoS One.* 2019;14(11).
  36. Breger J, Fuchs BB, Aperis G, Moy TI, Ausubel FM, Mylonakis E. Antifungal Chemical Compounds Identified Using a *C. elegans* Pathogenicity Assay. 2007;3(2).
  37. Huang X, Li D, Xi L, Mylonakis E. *Caenorhabditis elegans*: A simple nematode infection model for *Penicillium marneffeii*. *PLoS One.* 2014;9(9):1–6.
  38. Fan D, Hodges DM, Zhang J, Kirby CW, Ji X, Locke SJ, et al. Commercial extract of the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* enhances phenolic antioxidant content of spinach (*Spinacia oleracea* L.) which protects *Caenorhabditis elegans* against oxidative and thermal stress. *Food Chem [Internet].* 2011;124(1):195–202. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.008>
  39. Wiegant FAC, Surinova S, Ytsma E, Langelaar-Makkinje M, Wikman G, Post JA. Plant adaptogens increase lifespan and stress resistance in *C. elegans*. *Biogerontology.* 2009;10(1):27–42.
  40. Duangjan C, Rangsinth P, Gu X, Zhang S, Wink M, Tencomnao T. *Glochidion zeylanicum* leaf extracts exhibit lifespan extending and oxidative stress resistance properties in *Caenorhabditis elegans* via DAF-16 / FoxO and SKN-1 / Nrf-2 signaling pathways. *Phytomedicine [Internet].* 2019;64:1–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.153061>
  41. Wang X, Wang X, Li L, Wang D. Lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* by DMSO is dependent on *sir-2.1* and *daf-16*. *Biochem Biophys Res Commun [Internet].* 2010;400(4):613–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.08.113>
  42. Couillault C, Ewbank JJ. Diverse bacteria are pathogens of *Caenorhabditis elegans*. *Infect Immun.* 2002;70(8):4705–7.

L'ensemble des travaux réalisés au cours de cette étude a permis de développer et de valider :

- Une méthode d'extraction différentielle d'un fromage au lait cru (caillé lactique caprin), en utilisant 5 solvants de polarités différentes, conduisant à l'obtention de 9 extraits de nature différente. L'efficacité de cette méthode d'extraction a été validée par le suivi des rendements d'extraction au cours de la réalisation d'une étude dite par « épuisement ».
- L'utilisation du modèle *in vivo* nématode *C. elegans*, en tant que crible biologique, afin d'évaluer l'impact des extraits sur le vieillissement et plus particulièrement le paramètre « longévité ». Parmi les extraits issus du fromage étudié, 6 ont présenté un effet bénéfique sur la longévité du nématode (fromage lyophilisé, extrait apolaire, 3 extraits aqueux et le résidu final du fromage).

Les travaux de recherche ont été poursuivis afin :

- De déterminer les mécanismes biologiques impliqués dans les effets observés suite à la supplémentation des milieux par les extraits issus du fromage étudié, permettant une augmentation de la longévité du nématode (processus biologiques impliqués dans la sénescence du nématode, sensibilité au stress oxydant).
- De définir l'origine des métabolites bioactifs présents dans les extraits issus du fromage de chèvre étudié. En effet, le fromage étant la résultante de la coagulation et de la fermentation du lait, les molécules rencontrées dans le fromage sont donc pour la plupart des molécules issues du lait, et pour d'autres, des molécules issues du processus de fermentation à partir de substrats laitiers. Il est donc important de définir si les métabolites actifs sont directement issus du lait ayant servi à la production du fromage ou bien s'ils sont spécifiques du fromage, c'est-à-dire obtenus lors du procédé de transformation fromagère (notamment lors des étapes de fermentation).

L'ensemble de ces travaux constitue le corps du second chapitre de la partie « Résultats » de ce manuscrit de thèse.

## Chapitre 2 : Détermination des mécanismes biologiques par lesquels les extraits issus du fromage étudié induisent une augmentation de la longévité du nématode *Caenorhabditis elegans*

De nombreuses études ont mis en évidence la relation entre l'alimentation et la santé, avec pour objectif d'améliorer à la fois la prévention de pathologies et l'espérance de vie [178,179]. Parmi les différentes catégories de produits alimentaires, les aliments fermentés ont retenu notre attention car ils possèdent une riche biodiversité microbienne pouvant constituer une source intéressante de métabolites, dont certains pourraient exercer un effet bénéfique sur la santé [66,67]. Notre précédente étude (cf. chapitre précédent) a révélé que plusieurs extraits obtenus à partir d'un fromage de chèvre au lait cru avaient la capacité d'induire l'augmentation de la longévité du nématode *Caenorhabditis elegans*.

Les travaux de recherche ont été poursuivis afin de déterminer les mécanismes biologiques par lesquels les 5 extraits de fromage de chèvre (fromage lyophilisé, l'extrait apolaire et les 3 extraits aqueux) induisent l'augmentation de la longévité du nématode. Pour cela, nous avons choisi d'étudier l'impact de ces 5 extraits de fromage de chèvre sur :

- La voie insulín-like DAF-2/DAF-16 (décrite comme étant impliquée dans le phénomène de longévité chez le nématode). Pour cela, nous avons évalué l'impact des 5 extraits : *i*) sur la longévité (réalisation et analyse comparative de courbes de survie) d'une souche mutante du nématode (souche GR1307) n'exprimant pas le facteur de transcription DAF-16 ; *ii*) sur la localisation cellulaire de la protéine DAF-16 à l'aide d'une seconde souche mutante (souche TJ356) exprimant une protéine de fusion DAF-16::GFP (Green Fluorescent Protein) et par observation microscopique ; *iii*) sur l'expression du gène *daf-16* (par RT-qPCR) chez le ver sauvage (souche N2).
- La protection du nématode en condition de stress oxydant. Pour cela, nous avons évalué la capacité des extraits à augmenter la survie du nématode sur un milieu oxydant. L'implication des voies biologiques DAF-2/DAF-16 et p38 MAPK dans l'action des extraits a été étudiée, à l'aide de souches mutantes de nématode (souches GR1307 et IG10) et d'une étude par RT-qPCR sur la souche sauvage du nématode



(souche N2). En parallèle, la capacité des extraits à réduire la production de radicaux libres sur un modèle *in vitro* de leucocytes humains a été évaluée.

Les résultats obtenus montrent qu'en l'absence du facteur de transcription DAF-16, les 5 extraits de fromage testés n'ont plus la capacité d'augmenter la longévité du ver. DAF-16 est donc nécessaire pour que les extraits de fromage de chèvre induisent l'augmentation de la longévité du nématode. L'implication de ce facteur de transcription a aussi été mise en évidence lors des études de transcriptomique et de suivi de sa localisation intracellulaire. Concernant l'étude réalisée en condition de stress oxydant, il a été montré que les 5 extraits de fromage de chèvre avaient la capacité d'augmenter la survie du ver dans ces conditions oxydantes. Aussi, parmi ces 5 extraits, seule l'action de l'extrait apolaire semble passer par les deux voies étudiées (DAF-2/DAF-16 et p38 MAPK) pour augmenter la survie du ver en conditions oxydantes. De plus, il a aussi été montré que seuls l'extrait apolaire et un des extraits aqueux issus du fromage de chèvre ont entraîné une diminution de la production de radicaux libres par les leucocytes humains stimulés avec du phorbol myristate acetate (PMA).

Étant donné que le fromage est un aliment fermenté obtenu à partir du lait, une dernière étude a été menée pour déterminer l'impact de la fermentation sur la production des métabolites bioactifs. Pour réaliser cela, la même méthode d'extraction que celle utilisée pour fractionner le fromage de chèvre (cf. chapitre 1) a été appliquée sur le lait de chèvre, et l'impact des extraits obtenus a été étudié sur la longévité et la survie du nématode cultivé en condition de stress oxydatif. Il a été montré que le lait de chèvre et ses extraits ont des effets moins importants sur le nématode que les extraits équivalents issus du fromage. Ces derniers résultats valident donc la pertinence de travailler à partir de cet aliment fermenté et qu'il y a donc une forte probabilité que les métabolites bioactifs responsables des activités biologiques mises en évidence soient issus de la fermentation du lait en fromage.

Ce travail a donné lieu à une publication dans une revue internationale à comité de lecture [180].

### **A mechanistic study of the anti-aging effect of raw-milk cheese extracts**

Guillaume Cardin, Cyril Poupet, Muriel Bonnet, Philippe Veisseire, Isabelle Ripoché, Pierre Chalard, Anne Chauder, Etienne Saunier, Julien Priam, Stéphanie Bornes, Laurent Rios  
Nutrients (2021)

<https://doi.org/10.3390/nu13030897>

# A Mechanistic Study of the Antiaging Effect of Raw-Milk Cheese Extracts

Guillaume Cardin <sup>1,\*</sup>, Cyril Poupet <sup>1</sup>, Muriel Bonnet <sup>1</sup>, Philippe Veisseire <sup>1</sup>, Isabelle Ripoche <sup>2</sup>, Pierre Chalard <sup>2</sup>, Anne Chauder <sup>3</sup>, Etienne Saunier <sup>3</sup>, Julien Priam <sup>3</sup>, Stéphanie Bornes <sup>1</sup> and Laurent Rios <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Université Clermont Auvergne, INRAE, VetAgro Sup, UMRP, F-15000 Aurillac, France; cyril.poupet@uca.fr (C.P.); muriel.bonnet@uca.fr (M.B.); philippe.veisseire@uca.fr (P.V.); stephanie.bornes@uca.fr (S.B.); laurent.rios@vetagro-sup.fr (L.R.)

<sup>2</sup> Université Clermont Auvergne, CNRS, Clermont Auvergne INP, ICCF, F-63000 Clermont-Ferrand, France; isabelle.ripoche@sigma-clermont.fr (I.R.); pierre.chalard@sigma-clermont.fr (P.C.)

<sup>3</sup> Dômes Pharma, ZAC de Champ Lamet, 3 Rue Andrée Citroën, 63284 Pont-du-Château, France; a.chauder@domespharma.com (A.C.); e.saunier@domespharma.com (E.S.); j.priam@domespharma.com (J.P.)

\* Correspondence: guillaume.cardin@vetagro-sup.fr; Tel.: +33-4-73-98-70-35

**Abstract:** Many studies have highlighted the relationship between food and health status, with the aim of improving both disease prevention and life expectancy. Among the different food groups, fermented foods have huge microbial biodiversity, making them an interesting source of metabolites that could exhibit health benefits. Our previous study highlighted the capacity of raw goat milk cheese, and some of the extracts recovered by the means of chemical fractionation, to increase the longevity of the nematode *Caenorhabditis elegans*. In this article, we pursued the investigation with a view toward understanding the biological mechanisms involved in this phenomenon. Using mutant nematode strains, we evaluated the implication of the insulin-like DAF-2/DAF-16 and the p38 MAPK pathways in the phenomenon of increased longevity and oxidative-stress resistance mechanisms. Our results demonstrated that freeze-dried raw goat milk cheese, and its extracts, induced the activation of the DAF-2/DAF-16 pathway, increasing longevity. Concerning oxidative-stress resistance, all the extracts increased the survival of the worms, but no evidence of the implication of both of the pathways was highlighted, except for the cheese-lipid extract that did seem to require both pathways to improve the survival rate. Simultaneously, the cheese-lipid extract and the dried extract W70, obtained with water, were able to reduce the reactive oxygen species (ROS) production in human leukocytes. This result is in good correlation with the results obtained with the nematode.

**Keywords:** raw-milk cheese; *Caenorhabditis elegans*; longevity; oxidative stress; DAF-16; p38 MAPK

## 1. Introduction

In the last few years, many studies have highlighted the relationship between diet and health status with the aim of improving both disease prevention and life expectancy. Among the different food groups, fermented foods, which represent an important part of our diet, have a huge microbial biodiversity that makes them an interesting source of metabolites that could exhibit health benefits. Recent studies have demonstrated that fermented foods may exhibit various beneficial effects on health, such as a cardiovascular protective effect [1,2] or an anti-proliferative activity in the field of cancer prevention [3]. In a previous study [4], we focused our interest on one particular fermented food, raw goat milk cheese. We highlighted the development of a new methodology allowing us to fractionate cheese, using chemical fractionation, and to highlight the effects of the whole cheese, as well as the resulting extracts, on the longevity of the nematode *Caenorhabditis elegans*. We demonstrated a pro-longevity effect of the freeze-dried cheese and of some of the extracts (a lipophilic extract, named cheese-lipid extract, and three different hydrophilic extracts, named W40, WF and W70) on an in vivo model, using the wild-type *C. elegans* N2 strain. The freeze-dried cheese presented the ability to increase the maximum lifespan by 63%. The cheese-lipid extract increased longevity up to 37%. The three hydrophilic extracts also increased the maximum lifespan, between 13% and 73%, depending on the concentration. Another notable particularity revealed by this assay was the percentage of the population remaining alive on the extracts after all the nematodes in the control group had died: freeze-dried cheese (13%), cheese-lipid extract (up to 5%) and hydrophilic extracts (between 4% and 16%).

In the present study, we pursued the investigation of the health benefits of raw goat milk cheese, and its metabolites, using the methodology developed in our previous study [4]. In order to better understand the mechanisms of the cheese extracts in increasing longevity, an exploration of the signaling pathways involved was performed using an in vivo *C. elegans* model. This model has shown to be efficient in many studies that evaluated the health impact of some plant extracts and microorganisms [5,6]. *C. elegans* was chosen for our studies because of its similarities with humans concerning the physiology of the intestinal cells [7] and the homology of many signaling pathways [8], that make it a relevant model for mechanistic studies. Many mutant strains are available, which allow us to characterize the implication of these signaling pathways in the effects of the extracts. In *C. elegans*, the aging process is modulated by highly conserved signaling pathways, such as the DAF-2/DAF-16 [8,9]. The transcription factor DAF-16 has been demonstrated to regulate downstream genes that influence longevity [10,11] and

may be involved in the mechanism of action of the extracts in increasing life expectancy. The implication of this pathway will be investigated by using a mutant strain that did not express the transcription factor DAF-16.

With aging, age-related affections become ever more prevalent. Many processes are involved in these affections, such as the oxidative process in which the reactive oxygen species (ROS) are implicated. These compounds cause damage to lipids, proteins and DNA, which results in the death of the cell [9] and, in the end, of the organism. Moreover, during aging, the defense mechanisms of the worms are weakened [9], leaving the nematode more sensitive to the oxidative stress, which can be combined with an excessive production of ROS [12]. Consequently, the capacity of the extracts to improve the nematode survival rate on an oxidative medium was investigated in parallel with the longevity test. In keeping with the exploration of the effects of the extracts on oxidative stress, an *in vitro* study was conducted to measure the ability of the extracts to reduce the ROS production in human leukocytes and to correlate the results obtained with those in the nematode.

As cheese is a fermented food prepared from milk, a final investigation was performed in order to estimate the impact of the milk fermentation on the production of bioactive metabolites. To do so, the same fractionation as described in our previous work [4] was performed on the nonfermented milk in order to obtain raw goat milk extracts that were then evaluated with a longevity and survival assay on the oxidative medium.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Milk and Cheese Samples

Raw goat milk, freshly collected, and raw goat cheese (ripened for 20 days) were taken from a local producer (Chèvrerie des Oliviers, Saint-Georges sur Allier, France). The milk was concentrated under vacuum and freeze-dried (FreeZone Triad Freeze Dryer, Labconco Corporation, Kansas City, MS, USA). The resulting solid was crushed with mortar and pestle and the freeze-dried milk (FDM) was kept in a waterproof container at 4 °C. The cheese was cut into small slices, freeze-dried and crushed with mortar and pestle. The freeze-dried cheese (FDC) was kept in a waterproof container at 4 °C [4].

### 2.2. Reagents and Solvents

Five-fluoro-2'-deoxyuridine (FUdR),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , amphotericin B (250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), NaOH, agarose, cholesterol,  $\text{CaCl}_2$ , NaCl, EDTA, RPMI,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ , potassium phosphate buffer,

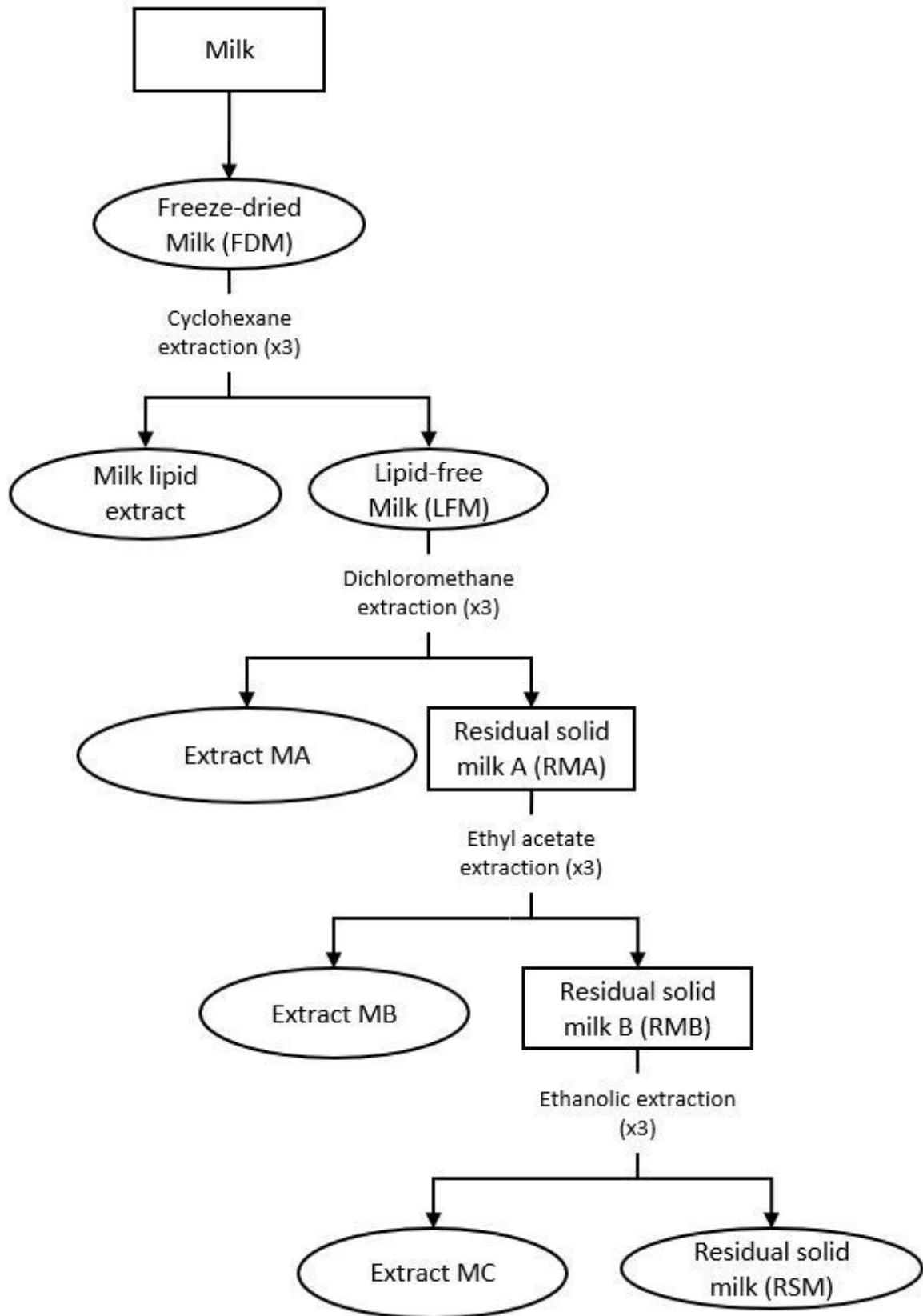
$\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NaHCO}_3$ , phorbol myristate acetate (PMA), fetal bovine serum (FBS), gentamicin, glutamine and resazurin were bought from Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, USA). lysogeny broth (LB, Miller's Modification), peptone and agar were obtained from Conda (Madrid, Spain). Yeast extract was obtained from Fisher Scientific (Hampton, VA, USA). Dihydrorhodamine 123 (DHR 123) was purchased from Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA). TRIzol was acquired from Ambion by life technologies (Carlsbad, CA, USA). The High-Capacity cDNA Archive kit was obtained from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Rotor-Gene SYBR Green Mix was acquired from Qiagen GmbH (Hilden, Germany) and primers from Eurogentec (Seraing, Belgium).

### 2.3. Obtaining of Milk Extracts

An extraction procedure was performed on the freeze-dried milk (FDM) to recover the different extracts, as mentioned in our previous article [4]. The apolar extract of the milk metabolites was recovered by adding distilled cyclohexane (ratio 1/10 (w/w)) to FDM powder and mechanically agitated for 4 h. The solution was then filtered with Büchner and evaporated under vacuum. The resulting solid was dissolved in cyclohexane (ratio 1/10 (w/v)) before filtering again to eliminate the residue of the milk and evaporated under vacuum to obtain the dry extract. The milk matrix was exhausted by repeating the same procedure three times, under the same conditions at different times (4 h, 2 h and 1 h, respectively). The resulting dry extracts were combined to constitute the final extract, known as denominated milk lipid extract. The residual solid, which was retained by the filtration, was dried under vacuum and named lipid-free milk (LFM) ([Figure 1](#)).

The LFM was extracted using a chemical fractionation to recover most of the compounds, which resulted in three successive solid/liquid extractions, with an increase of the polarity of the solvent at each step: dichloromethane, ethyl acetate and absolute ethanol ([Figure 1](#)). For each solvent, the protocol used was the same as with cyclohexane, but with a 1/10 (w/v) ratio. The final dried extracts were denominated as extracts MA, MB and MC, respectively.

The residual solid from the absolute ethanol extraction was dried under vacuum and named residual solid milk (RSM). Each dried milk extract was kept in a waterproof container at  $-25^\circ\text{C}$ , under argon.



**Figure 1.** Preparation of the milk extracts. Ovals designate the milk extracts used for our biological studies (FDM (freeze-dried milk), milk lipid extract, LFM (lipid-free milk), and extracts MA (obtained with dichloromethane), MB (obtained with ethyl acetate), MC (obtained with absolute ethanol) and RSM (residual solid milk)).

#### 2.4. Obtaining of Cheese Extracts

The same cheese extracts were used in this study as in our previous work [4]. The cheese extracts were obtained from the goat cheese by successive chemical extractions as described in the previous study. Briefly, the same extraction procedure as for the milk was applied to the freeze-dried cheese (FDC) to obtain a cheese-lipid extract, which was extracted with cyclohexane, as well as lipid-free cheese. From this residue, extract A and residue RA were then obtained with dichloromethane. Next, extract B and residue RB were obtained from the residue RA with ethyl acetate. To finish, extract C and residue RC were obtained from the residue RB with absolute ethanol. A fifth extraction was performed on the residual solid RC recovered from the ethanolic extraction to obtain yet another extract. HPLC-grade water was added to this solid (ratio of 1/10 (w/v)) and the mixture was mechanically agitated for 1 h at 40 °C. The mixture was then centrifuged (8000 rpm, 15 min; Avanti J26S XPI, Beckman Coulter, Brea, CA, USA) and the supernatant was concentrated under vacuum, filtered to eliminate the residue of cheese and evaporated. Finally, the resulting solid was dried under vacuum. The cheese matrix was exhausted by repeating the same procedure three times, under the same conditions. The resulting dry extracts were combined to constitute the final extract, ground with mortar and pestle and denominated extract WF.

Two additional extracts were obtained by performing a water extraction on the lipid-free cheese, at two different temperatures (40 °C and 70 °C). The extraction procedure was the same as that for the extract WF described above, with the exception of the temperature. The resulting extracts were named W40 (extracted at 40 °C) and W70 (extracted at 70 °C).

Each dried cheese extract was kept in a waterproof container at -25 °C, under argon. The following experiments were performed using the FDC, the cheese-lipid extract and the extracts W40, W70 and WF, all of which presented a beneficial effect on the worms' lifespan in our previous study.

#### 2.5. Microbial Strains, Growth Conditions and Heat-Killed Preparation

The *Escherichia coli* strain OP50 was provided by the *Caenorhabditis* Genetics Center (Minneapolis, MN, USA) and used as a food source during the worms' maintenance. *E. coli* OP50 was grown in lysogeny broth medium at 37 °C overnight. The microbial suspension was centrifuged (15 min, 4000 rpm; Rotofix 32A, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany) and washed with M9 buffer (per L: 3 g of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 6 g of Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 5 g of NaCl; 1 mL of 1 M MgSO<sub>4</sub>). The microbial suspension was adjusted to obtain a 100 mg/mL final concentration. During the experiments the worms were fed with heat-killed (HK) *E. coli* OP50. *E. coli* (100

mg/mL) (from the resulting suspension) was heat-killed at 70 °C for 1 h and the solution was kept at 4 °C until use.

## 2.6. *C. elegans* Maintenance

The *Caenorhabditis elegans* N2 (wild-type), and the different mutants TJ356 (*daf-16p::daf-16a/b::GFP + rol-6(su1006)*), GR1307 (*daf-16(mgDf50)*) and IG10 (*tol-1(nr2033)*) strains were acquired from the *Caenorhabditis* Genetics Center. The nematodes were cultured at 20 °C on nematode growth medium (NGM) plates (per L: 3 g of NaCl; 2.5 g of peptone; 17 g of agar; 5 mg of cholesterol; 1 mM of CaCl<sub>2</sub>; 1 mM of MgSO<sub>4</sub>; 25 mL of 1 M potassium phosphate buffer at pH 6), supplemented with yeast extract (4 g/L) (NGMY) and seeded with live *E. coli* OP50 [13–15].

## 2.7. Synchronisation of Wild-Type *C. elegans* and Mutant Strains

In order to avoid any variation in the results due to the age differences in the population, a synchronization of the worms was performed. Gravid worms and eggs were collected from NGMY plates and washed off using M9 buffer before centrifuging (2 min, 1500 rpm; Rotofix 32A, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany). Five milliliters of worm bleach (2.5 mL of M9 buffer, 1.5 mL of bleach, 1 mL of sodium hydroxide 5 M) were added to the pellet and vigorously shaken until adult worm body disruption. Forty milliliters of M9 buffer were then introduced to block the effect of the worm bleach. The egg suspension was centrifuged (2 min, 1500 rpm) and washed twice with 20 mL of M9 buffer. The isolated eggs hatched at 25 °C for 24 h in 20 mL of M9 buffer, under slow agitation. The resulting L1 larvae were then transferred onto NGMY plates, seeded with live *E. coli* OP50 as a food source and maintained at 20 °C until they reached the L4/young adult stage [13–15].

## 2.8. *Caenorhabditis elegans* Longevity Assay Incubated With Dried Milk Extracts

The effect of the dried milk extracts on the life expectancy of the worms was evaluated by performing a longevity assay using the wild-type *C. elegans* N2 strain. An agar medium (per L: 3 g of NaCl and 6 g of agarose) was prepared, stored at 40 °C and split into aliquots that were individually supplemented with the dried milk extracts at the suitable concentration, according to the physicochemical properties of the extracts (Table 1). The supplemented aliquot was then poured, at 40 °C, into a 24-well plate with 0.12 mM of FUDR. The aliquot was also supplemented with amphotericin B (final concentration of 16 µg/mL), in the case of the lipid-free milk (LFM), to prevent any significant fungal development, which is commonly observed with this extract [16]. The presence or absence of the antifungal established two control conditions: with and



without amphotericin B. To densify the agar, the plates were immediately moved onto ice after pouring, and kept at 4 °C until being used. Once adult, worms were incubated on a supplemented agar medium (or agar medium for the control condition) with ~15 worms per well, with HK *E. coli* OP50 as a food source, and kept at 20 °C for the duration of the assay. To avoid starvation, food was added every 3 days in the wells (20 µL of 100 mg/mL suspension). Nematodes were observed daily and were considered dead when they did not respond to a gentle mechanical stimulation. The effect of the LFM was evaluated in comparison with the control condition with amphotericin B and food (CC2), whereas the effect of the other extracts was evaluated in comparison with the control condition with food only (CC1). This assay was performed as at least three independent experiments containing three wells per condition and conducted simultaneously with the control conditions. Complementary information was taken into account to determine the effects of the extracts: the observation of the relative position of the curves, the value of the mean and maximum lifespan and the percentage of the population that was still alive on the supplemented medium when the worms in the control condition were all dead [4].

**Table 1.** Concentrations of the dried milk extracts used for supplementing the medium. Concentrations are expressed in percentage of extracts relative to the volume of medium.

Extracts	Concentration (w/v)		
	0.25%	0.5%	1%
Freeze-dried milk (FDM)	X	X	
Milk lipid extract (ML)	X	X	X
Lipid-free milk (LFM)	X	X	X
Extract MA	X	X	
Extract MB		X	
Extract MC	X	X	
Residual solid milk (RSM)	X	X	X

### 2.9. Longevity Assay of DAF-16 Loss of Function Mutant (GR1307 Strain) Incubated With Dried Cheese Extracts

In order to determine the implication of DAF-16 in extending the longevity of the worms incubated with dried cheese extracts, a longevity assay was conducted with the *C. elegans* GR1307 strain (DAF-16 loss-of-function). To prepare the supplemented agar medium with the cheese extracts, the same protocol described above was applied. The dried cheese extracts were used at 0.5% and 1% concentrations (w/v) for supplementing the medium. The aliquots were

also supplemented with amphotericin B (1.6 µg/mL) in the case of the freeze-dried cheese (FDC) and the cheese-lipid extract, to prevent any significant fungal development. The effects of the FDC and the cheese-lipid extract were evaluated in comparison with the control condition with amphotericin B and food (CC2), whereas the effects of the extracts W40, W70 and WF were evaluated in comparison with the control condition with food only (CC1). This assay was performed as at least four independent experiments containing three wells per condition and conducted simultaneously with the control conditions.

### 2.10. Cellular Localisation of DAF-16::GFP

In order to study the biological activity of dried cheese extracts, an experiment was performed using transgenic TJ356 worms (DAF-16::GFP). The nuclear localization of the transcription factor was determined thanks to fluorescence, as described by Poupet et al. [14]. The same agar medium as described for the longevity assay was prepared, cooled down to 40 °C and supplemented with 5 mg/L of cholesterol, 1 mM of CaCl<sub>2</sub>, 1 mM of MgSO<sub>4</sub> and 1 M of potassium phosphate buffer at pH 6 (25 mL for 1 L of medium). The medium was then split into aliquot, and individually supplemented with cheese extracts at 1% (w/v) and poured into a 24-well plate before being immediately transferred onto ice to densify the agar, and stored at 4 °C until use. Once adult, worms were incubated on a cheese-extract agar plate for 2 h and 4 h at 20 °C, with food (heat-killed *E. coli* OP50). The translocation of DAF-16::GFP was scored by assaying the presence of the GFP accumulation in the *C. elegans* cell nuclei, using a 40× magnification fluorescence microscope (Evos FL, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) [17].

### 2.11. Survival of the Worms on the Oxidative Medium

The experiment was performed to determine the potential antioxidant activity of dried milk and cheese extracts as a preventive measure. This study was performed with the wild-type *C. elegans* N2 strain for the milk and cheese extracts. The experiment was also performed with the GR1307 strain (DAF-16 loss-of-function) and the IG10 strain (TOL-1 loss-of-function), but only for the dried cheese extracts. This assay was performed according to Grompone et al. (2012) [18], with some modifications. The same agar medium as described for the longevity assay was prepared and supplemented as described above with dried milk or cheese extracts at 1% (w/v). The aliquots were supplemented with food (40 µL of HK *E. coli* OP50 suspension at 100 mg/mL) for each condition, before being poured, at 40 °C, into a 24-well plate with 0.12 mM of FUdR. The aliquots were also supplemented with amphotericin B (1.6 µg/mL) in the case of the lipid-free milk (LFM), freeze-dried cheese (FDC) and cheese-lipid extract to prevent

any significant fungal development. As described above, two control conditions were used during the assay: with and without amphotericin B. After pouring, the plates were immediately transferred onto ice to densify the agar, and stored at 4 °C until use. Once adult, worms were incubated on a supplemented agar medium (or agar medium for the control condition) with ~50 worms per well, and the worms were incubated for 5 days at 20 °C. After incubation, the worms were transferred onto an agar medium with or without hydrogen peroxide (3 mM in the medium). After 3 h 30 min of contact, the worm survival rate  $\tau$  was scored and expressed with the following formula:

$$\tau = \frac{\left(\frac{n_{\text{livingwormsatt=3h30}}}{n_{\text{livingwormsatt=0h}}}\right)_{\text{mediumwith } H_2O_2}}{\left(\frac{n_{\text{livingwormsatt=3h30}}}{n_{\text{livingwormsatt=0h}}}\right)_{\text{mediumwithout } H_2O_2}}, \quad (1)$$

A worm was considered as dead when it did not respond to a mechanical stimulus. The effect of the LFM, FDC and the cheese-lipid extract was evaluated in comparison with their respective control condition with amphotericin B and food (CC2) whereas the effect of the other extracts was evaluated in comparison with their respective control condition with food only (CC1). This assay was performed as at least four independent experiments containing three wells per condition and conducted simultaneously with the control conditions.

## 2.12. Determination of the Expression of Gene of Interest

### 2.12.1. Incubation of the Worms

In order to determine the expression of the gene of interest (GOI), an RNA isolation and RT-quantitative PCR were performed with the wild-type *C. elegans* N2 strain. The experiment was conducted in order to evaluate the gene expression at two incubation times as determined in the longevity assay performed in our previous study [4]: at 3 days (start of the decrease in the population during the longevity assay) and at 10 days (mean lifespan of the control population during longevity assay). The worms were incubated on the medium supplemented with the cheese extracts at 1% (w/v) as described for the longevity assay, in 55 mm diameter Petri dishes (1 per replicate and per time). Once adult, worms were incubated on a supplemented agar medium (or agar medium for the control condition) with ~500 worms per well (3 days) or ~1000 worms (10 days), provided with the necessary amount of food for each time and kept at 20 °C. The freeze-dried cheese (FDC) and the cheese-lipid extract were compared to the control condition with amphotericin B and food (CC2), whereas the extracts W40, W70 and WF were compared to the control condition with food only (CC1). This assay was performed as at least three independent experiments.

### 2.12.2. RNA Isolation and RT-Quantitative PCR

The RNA isolation and RT-quantitative PCR were adapted from Poupet et al. [19]. After a 3- or 10 day-incubation period, the worms were collected with M9 buffer. The total RNA was extracted by adding 500 µL of TRIzol reagent. The worms were disrupted by using a Precellys (Bertin instruments, Montigny-le-Bretonneux, France) and glass beads (PowerBead Tubes Glass 0.1 mm, Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA, USA). The beads 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. The tubes were vortexed for 30 s and incubated at room temperature for 3 min. The tubes were then centrifuged (12,000 rpm, 15 min, 4 °C) and the phenolic phase was removed. The aqueous phase was treated again with chloroform. The RNA was precipitated in the second aqueous phase by adding 250 µL of isopropanol. The tubes were incubated at room temperature for 4 min before centrifugation (12,000 rpm, 10 min, 4 °C). The supernatant was discarded, and the pellet was washed with 1000 µL of 70% ethanol. The supernatant was discarded after centrifugation (14,000 rpm, 5 min, 4 °C) and the pellet was dissolved into 20 µL of RNase-free water. Then, 2 µg of RNA was reverse-transcribed using the High-Capacity cDNA Archive kit, according to the manufacturer’s instructions. For real-time qPCR assay, each reaction contained 2.5 µL of cDNA, 6.25 µL of Rotor-Gene SYBR Green Mix, 1.25 µL of 10 µM primers (Table 2) and 1.25 µL of RNase-free water. All samples were run in triplicate. Rotor-Gene Q Series Software (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) was used for the analysis. In our study, one reference gene, Y45F10D.4, was used in all of the experimental groups. The quantification of GOI expression ( $E_{GOI}$ ) was performed according to Equation (2) [20]:

$$E_{GOI} = \frac{(GOI \text{ efficiency})^{\Delta Ct_{GOI}}}{(Y45F10D.4 \text{ efficiency})^{\Delta Ct_{Y45F10D.4}}}, \quad (2)$$

**Table 2.** Targeted *C. elegans* genes primers for qPCR analysis.

Gene Name	Gene Type	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	Reference
Y45F10D.4	housekeeping	CGAGAACCCGCGAAATGTCGGA	CGGTTGCCAGGGAAGATGAGGC	[19]
<i>daf-16</i>	GOI	TTCAATGCAAGGAGCATTTG	AGCTGGAGAAACACGAGACG	[19,21]
<i>sek-1</i>	GOI	GCCGATGGAAAGTGGTTTTA	TAAACGGCATCGCCAATAAT	[19,21]
<i>pmk-1</i>	GOI	CCGACTCCACGAGAAGGATA	AGCGAGTACATTCAGCAGCA	[19,21]

### 2.13. *Leukocyte Viability*

Blood was collected from healthy human volunteers ( $n = 22$ ; Etablissement Français du Sang, EFS, Clermont-Ferrand, France). Donors gave their written informed consent for the use of blood samples for research purposes under EFS contract n°16-21-62 (in accordance with the following articles: L1222-1, L1222-8, L1243-4 and R1243-61 of the French Public Health Code). The whole-blood leukocytes were obtained by hemolytic shock using ammonium chloride solution ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 155  $\mu\text{M}$ ;  $\text{NaHCO}_3$  12  $\mu\text{M}$ , EDTA 0.01  $\mu\text{M}$ ). The leukocytes were then washed with RPMI, centrifuged ( $400\times g$ , 10 min) and resuspended in RPMI. The cell preparations were adjusted to  $10^6$  cells/mL with supplemented RPMI (FBS 10%, gentamicin 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and glutamine 2 mM). The cells were then placed in 96-well polystyrene plates (Cell Wells™, Corning, New-York, NY, USA), incubated with the dried extracts WF, W40, W70 or the dried cheese-lipid extract at 0, 10, 50, 100 or 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , PMA (1  $\mu\text{M}$ ) and resazurin (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). The extract WF was filtered at 0.22  $\mu\text{M}$  to avoid any significant fungal development. Fluorescence (excitation/emission: 544/590 nm) was recorded every 30 min for 2 h using the Fluoroskan Ascent FL® apparatus (ThermoFisher Scientific, Illkirch, France).

### 2.14. *Kinetics of ROS Production by Leukocytes*

Blood was collected from healthy human volunteers ( $n = 22$ ). The whole-blood leukocyte preparations were obtained and adjusted as previously described. The cells were placed in 96-well polystyrene plates, incubated with the dried extracts WF, W40, W70 or the dried cheese-lipid extract at 0, 10, 50, 100 or 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , and dihydrorhodamine 123 (DHR 123, 1  $\mu\text{M}$ ), and stimulated by 1  $\mu\text{M}$  PMA for 120 min to increase the ROS production. The extract WF was filtered at 0.22  $\mu\text{M}$  to avoid any significant fungal development. The fluorescence intensity of rhodamine 123, which is the reduced form of dihydrorhodamine 123 oxidation by ROS, was recorded every 5 min for 120 min (excitation/emission: 485/538 nm) using the Fluoroskan Ascent FL® apparatus.

### 2.15. *Statistical Analysis*

Results of lifespan experiments were examined by using the Kaplan–Meier method, and compared among group scoring for significance using the log-rank test with R software version 3.6.0. The differences between conditions, in the survival assay on the oxidative medium, the qPCR analysis, the cellular viability assay and the ROS production assay, were determined by using the Kruskal–Wallis test followed by an Uncorrected Dunn’s test using GraphPad Prism version 8.2.1 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Differences were considered statistically significant if  $p$ -value  $\leq 0.05$ .

### 3. Results

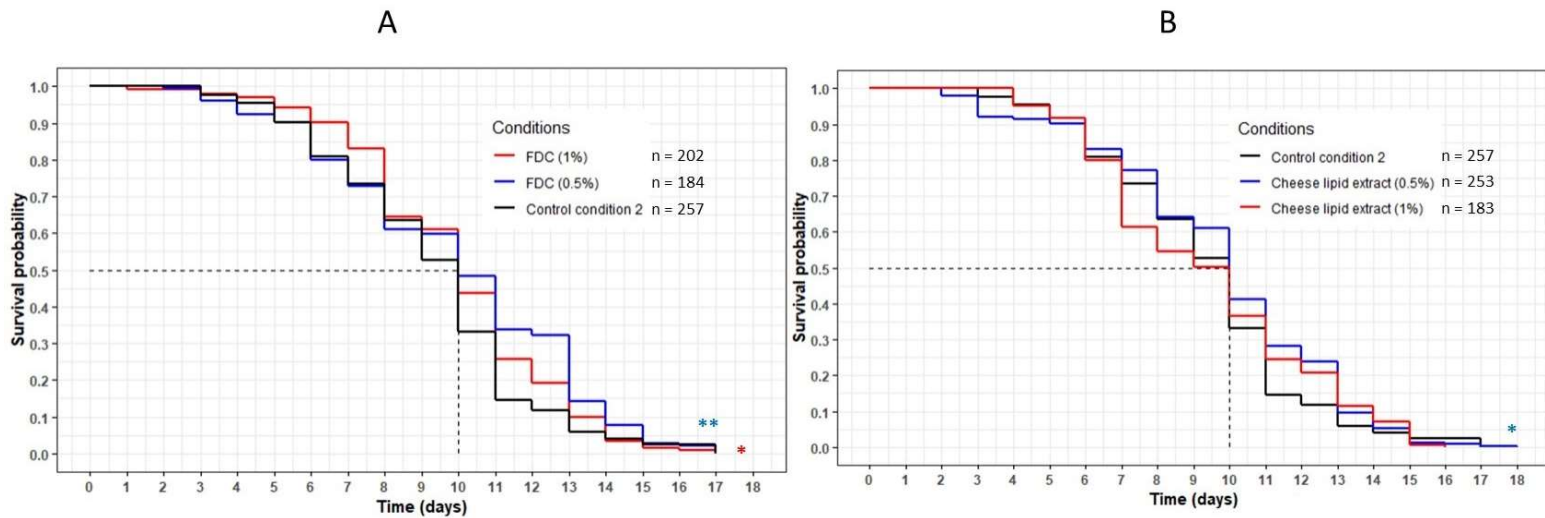
#### 3.1. Implication of DAF-16 in the Capacity of the Extracts to Induce an Increase in Longevity

In order to determine the implication of the transcription factor DAF-16 (involved in the longevity phenomenon) in the mechanisms of action of the dried cheese extracts (freeze-dried cheese (FDC), cheese-lipid extract, and WF, W40 and W70), a longevity assay was carried out using the GR1307 mutant strain that did not produce the protein. If the transcription factor DAF-16 was required, the extracts would no longer be able to induce an increase in the lifespan. In this regard, no variation of the beneficial effect of the cheese extracts should be noted.

The worms incubated with the FDC did not show any variation in longevity compared with the control CC2 condition ([Figure 2A](#)). The mean and maximum lifespans were identical between the control condition and both concentrations of FDC ([Table 3](#)). However, the significant difference observed between the curves representing the FDC and the CC2 ( $p = 0.001$  and  $p = 0.03$  for 0.5% and 1% concentration, respectively) suggests that the FDC was responsible for a beneficial effect on the worms, allowing a larger part of the population to remain alive for a given amount of time compared with the CC2.

The cheese-lipid extract showed a variation between the two concentrations. An increase in longevity was observed for the worms incubated on the extract at 0.5%, with a significant difference between this curve and the CC2 curve ( $p = 0.02$ ) ([Figure 2B](#)). The maximum lifespan was also higher, increasing from 17 (CC2) to 18 (+6%) days ([Table 3](#)). At 1%, the beneficial effects of the extract were no longer significant ( $p = 0.5$ ).

The worms incubated with the dried aqueous cheese extracts WF and W40 had a significant decrease in their lifespan compared with the control CC1 ( $p < 0.001$ ) ([Figure 3A,B](#)). The curves representing these extracts were significantly below the CC1 curve, with a decrease in the mean lifespan from 9 (CC1) to 8 days (WF at 1%, W40 at 0.5% and 1%). Concerning WF at 0.5%, the mean lifespan decreased from 9 to 7 days ([Table 4](#)). However, the maximum lifespan was higher for all conditions, with an increase of between 12% and 18% compared with CC1. Concerning the extract W70, no variation in lifespan was observed in comparison with CC1. The evolution of the curve was similar to that of the control condition for both concentrations ([Figure 3C](#)). An increase in the maximum lifespan was noted for a small proportion of the population of the worms (up to 5% of the population).



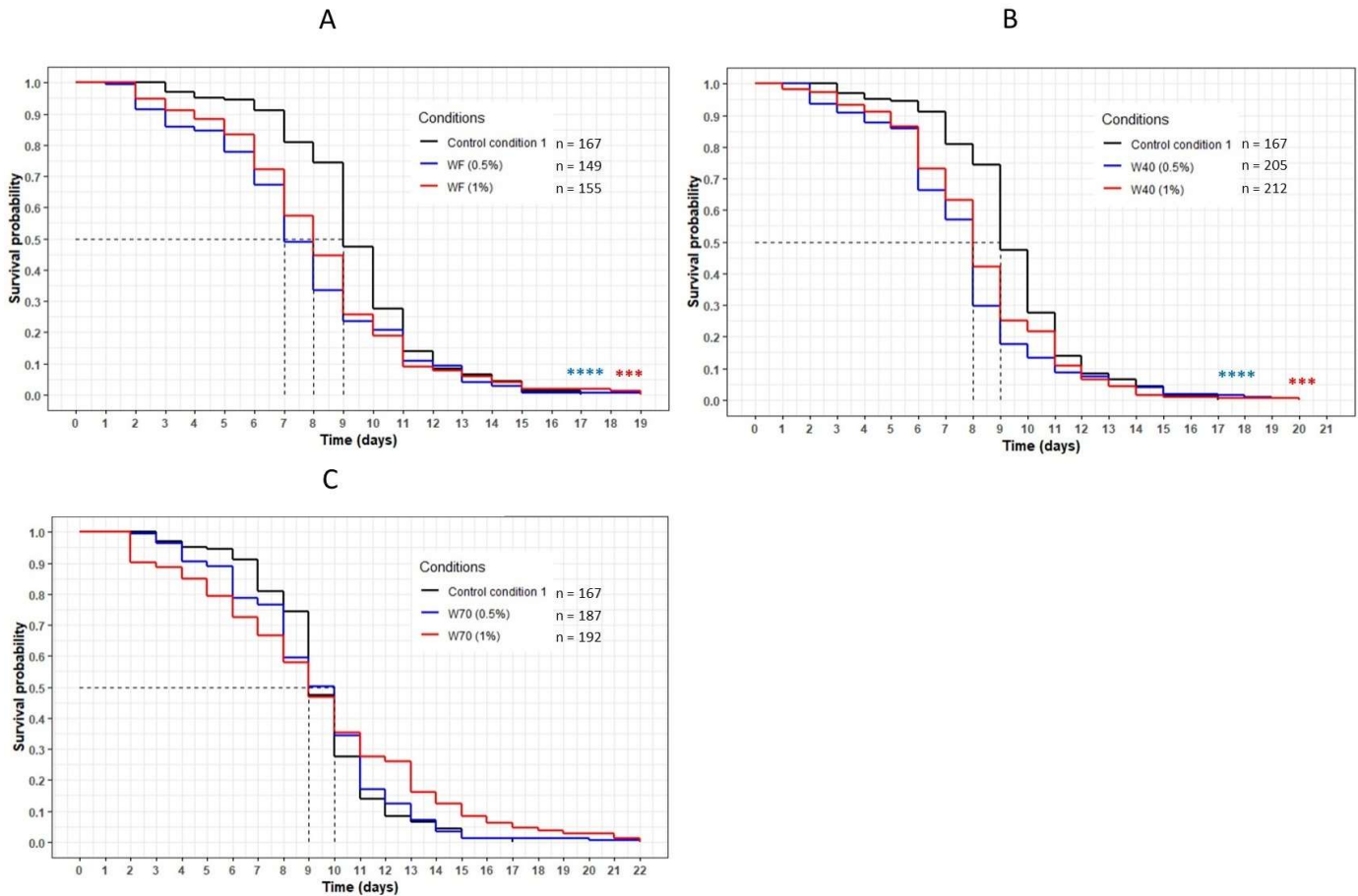
**Figure 2.** Influence of the FDC (freeze-dried cheese) (A) and the cheese-lipid extract (B) on the lifespan of *C. elegans* GR1307 strain. The worms were incubated on the medium supplemented with the dried extracts at day 0 and regularly fed with HK *E. coli* OP50. The conditions were considered significantly different when the *p*-value was lower than 0.05 (\*) or 0.01 (\*\*) (log-rank test). The asterisks next to the curves represent the differences with the control condition CC2. The asterisks next to the legend represent the differences between the extracts.

**Table 3.** Data of the longevity assay of the *C. elegans* GR1307 strain on the medium supplemented with the FDC (freeze-dried cheese) and the cheese-lipid extract, and CC2 as control. Mean lifespan, maximum lifespan and the percentage of population still alive were taken from the survival curves in Figure 2. *p*-values were calculated by comparing conditions with CC2 using the log-rank test.

Tested Conditions	Concentration (w/v) (%)	Mean Lifespan (Days)	Maximum Lifespan (Days)	Relative Increase in the Maximum Lifespan (%)	Percentage of Population Still Alive at 17 Days (%)	<i>p</i> -Value
CC2	-	10	17	-	0	-
Freeze-Dried Cheese (FDC)	0.5	10	17	0	0	0.001
	1	10	17	0	0	0.03
Cheese-lipid extract	0.5	10	18	+6	1	0.02
	1	10	16	-6	0	0.5

**Table 4.** Data of the longevity assay of the *C. elegans* GR1307 strain on the medium supplemented with the aqueous extracts WF, W40 and W70, and CC1 as a control. Mean lifespan, maximum lifespan and the percentage of population still alive were taken from the survival curves in Figure 3. *p*-values were calculated by comparing conditions with CC1 using the log-rank test.

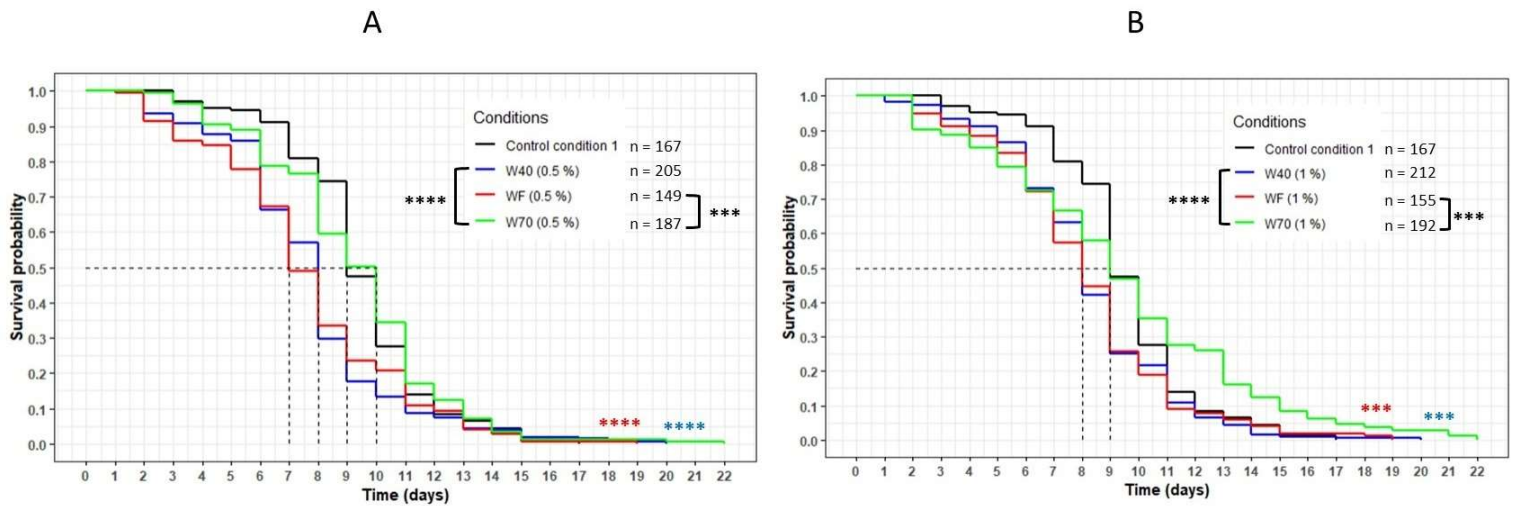
Tested Conditions	Concentration (w/v) (%)	Mean Lifespan (Days)	Maximum Lifespan (Days)	Relative Increase in the Maximum Lifespan (%)	Percentage of Population Still Alive at 17 Days (%)	<i>p</i> -Value
CC1	-	9	17	-	0	-
Extract WF (40 °C)	0.5	7	19	+12	1	<0.0001
	1	8	19	+12	2	0.0008
Extract W40 (40 °C)	0.5	8	19	+12	2	<0.0001
	1	8	20	+18	1	0.0002
Extract W70 (70 °C)	0.5	10	22	+29	2	0.9
	1	9	22	+29	5	0.09



**Figure 3.** The influence of the aqueous extracts WF (A), W40 (B) and W70 (C) on the *C. elegans* GR1307 strain lifespan. The worms were incubated on the medium supplemented with the dried extracts at day 0 and regularly fed with HK *E. coli* OP50. The conditions were considered significantly different when the *p*-value was lower than 0.001 (\*\*\*) or 0.0001 (\*\*\*\*) (log-rank test). The asterisks next to the curves represent the differences with the control condition CC1. The asterisks next to the legend represent the differences between the extracts.



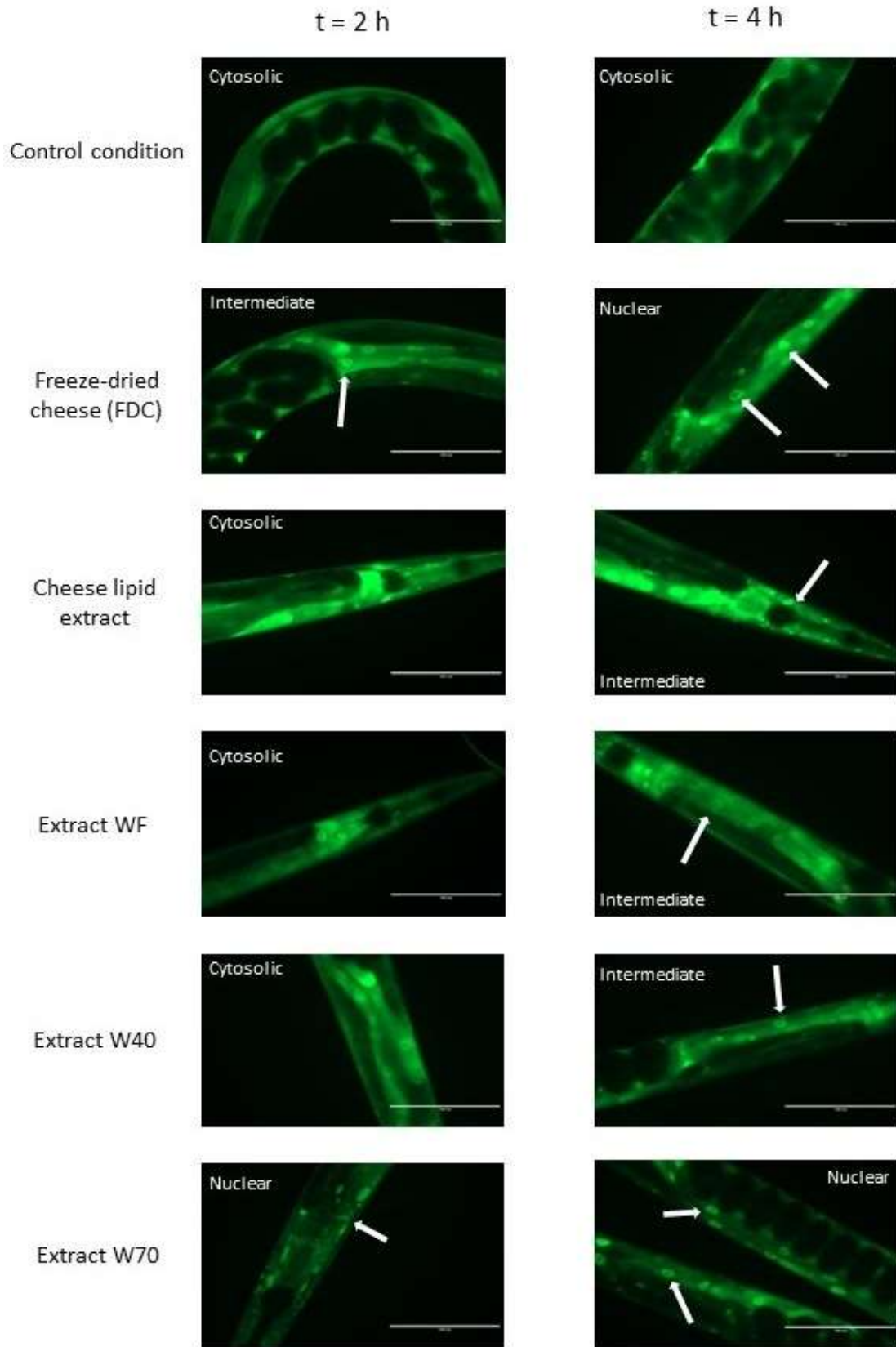
This result was reinforced by the comparison of the three extracts WF, W40 and W70 at the same concentration ([Figure 4](#)). For both concentrations, the curve representing W70 was significantly above the other curves corresponding to the extracts WF and W40 ( $p < 0.0001$  with W40;  $p = 0.0001$  with WF). These results confirmed that the transcription factor DAF-16 was required for the FDC, the cheese-lipid extract and the extracts WF, W40 and W70 in order to increase the lifespan of the nematode *C. elegans* significantly.



**Figure 4.** Comparison of the effect of the aqueous extracts WF, W40 and W70 at 0.5% (A) and 1% (B) concentration on the *C. elegans* GR1307 strain lifespan. The worms were incubated on the medium supplemented with the dried extracts obtained with water at day 0 and regularly fed with HK *E. coli* OP50. The conditions were considered significantly different when the  $p$ -value was lower than 0.001 (\*\*\*) or 0.0001 (\*\*\*\*) (log-rank test). The asterisks next to the curves represent the differences with the control condition CC1. The asterisks next to the legend represent the differences between the extracts.

### 3.2. Cellular Localisation of DAF-16::GFP

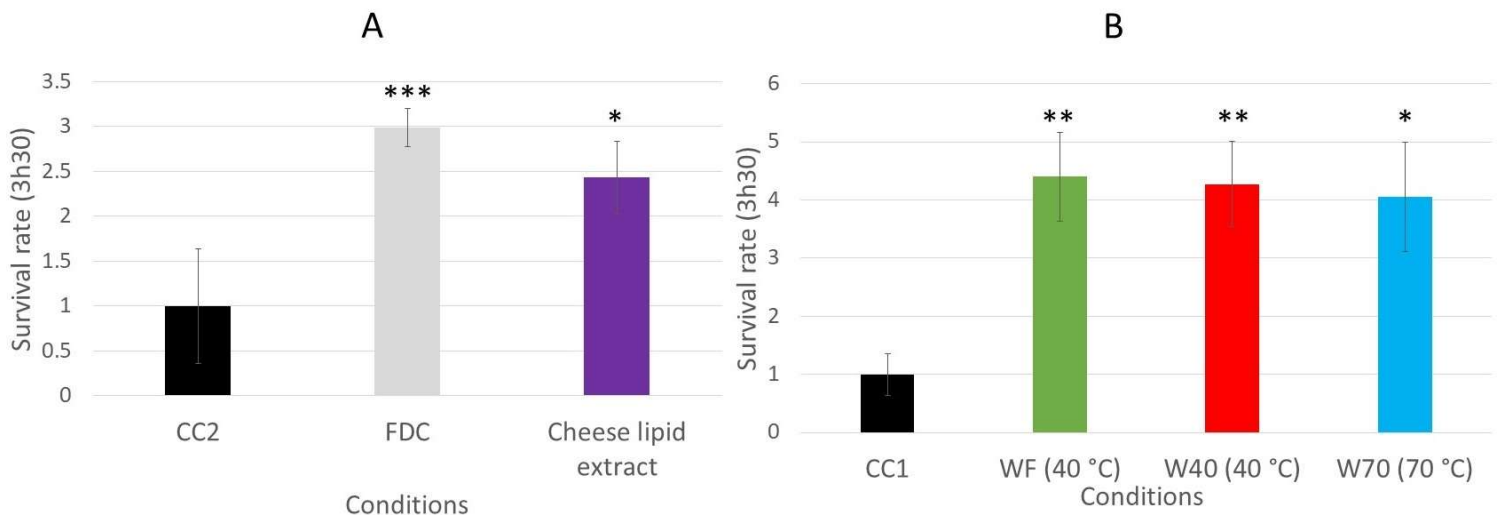
The nuclear translocation of the DAF-16/FOXO transcription factor was examined using the *C. elegans* TJ356 strain (which constitutively expresses the fusion protein DAF-16::GFP) ([Figure 5](#)). The localization of DAF-16 in the cells of the worms was established by fluorescence to determine if this signaling pathway was involved in the effects of the extracts. Figure 5 shows that the freeze-dried cheese (FDC) and the extract W70 were the only extracts that tended to induce a translocation of the transcription factor into the nuclei after 2 h of incubation. At 4 h, each extract tended to induce a translocation of DAF-16 into the nuclei. The control condition did not show any variation in DAF-16 cellular localization for the duration of the assay, suggesting that the translocation observed was induced by all of the extracts. These observations reinforced the results obtained from the longevity assays, suggesting that the transcription factor DAF-16 was involved in the mechanisms of action of the extracts.



**Figure 5.** The effects of the FDC (freeze-dried cheese) and the extracts on DAF-16 cellular localization in *C. elegans* transgenic strain TJ356 expressing DAF-16::GFP, after 2 h and 4 h of incubation on the supplemented medium. The arrows indicate the accumulation of the transcription factor in the nuclei. Scale bar: 100 μm.

### 3.3. Effect of the Dried Cheese Extracts on the Survival Rate of the Wild-Type *C. elegans* N2 Strain on the Oxidative Medium

The impact of the dried cheese extracts (freeze-dried cheese (FDC), cheese-lipid extract, WF, W40 and W70) on the survival rate of the wild-type *C. elegans* N2 strain on an oxidative medium was evaluated (Figure 6). The survival rate was determined by measuring the worm viability after 3 h 30 min incubation on an agar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-medium. The results demonstrated that the cheese extracts significantly influenced the ability of the worms to survive longer on the oxidative medium. Those incubated with the FDC and the cheese-lipid extract exhibited a better resistance to the oxidizing medium compared with the CC2 worms, with a survival rate of 3 ( $p = 0.0003$ ) and 2.4 ( $p = 0.0306$ ), respectively (Figure 6A). The same observation was made for the worms incubated with the cheese extracts WF, W40 and W70, where the survival rate increased to 4.4 ( $p = 0.0052$ ), 4.3 ( $p = 0.0091$ ) and 4.1 ( $p = 0.0181$ ), respectively, compared with the CC1 condition (Figure 6B). The cheese extracts exhibited a beneficial effect on the worms by improving their survival rate on the oxidative medium.



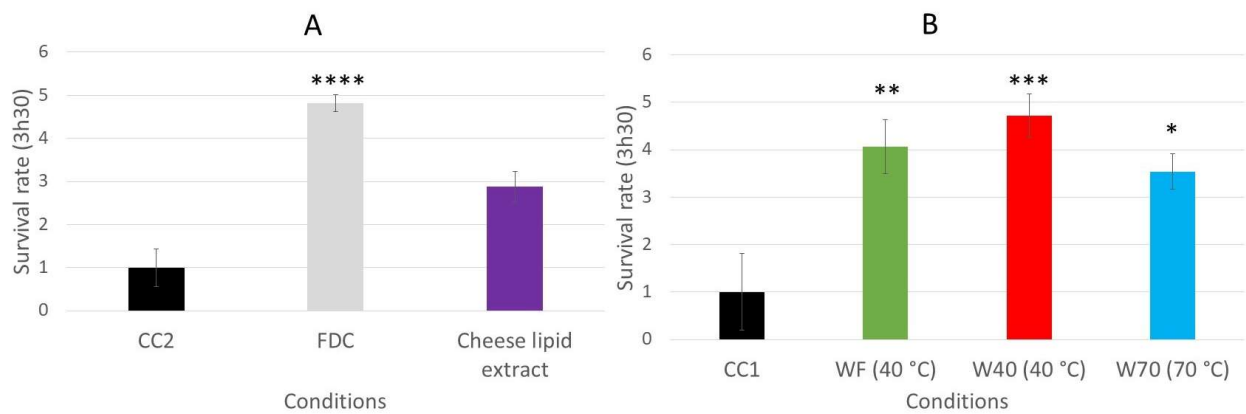
**Figure 6.** Relative survival rates of the wild-type *C. elegans* N2 strain on an oxidative medium after 5 days of incubation on a medium supplemented with FDC (freeze-dried cheese) and cheese-lipid extract (A) or aqueous extracts WF, W40 and W70 (B). The conditions were considered significantly different from the control when the  $p$ -value was lower than 0.05 (\*), 0.01 (\*\*), 0.001 (\*\*\*) (Kruskal–Wallis test).

### 3.4. Implication of the Signaling Pathways in the Survival of the *C. elegans* on the Oxidative Medium

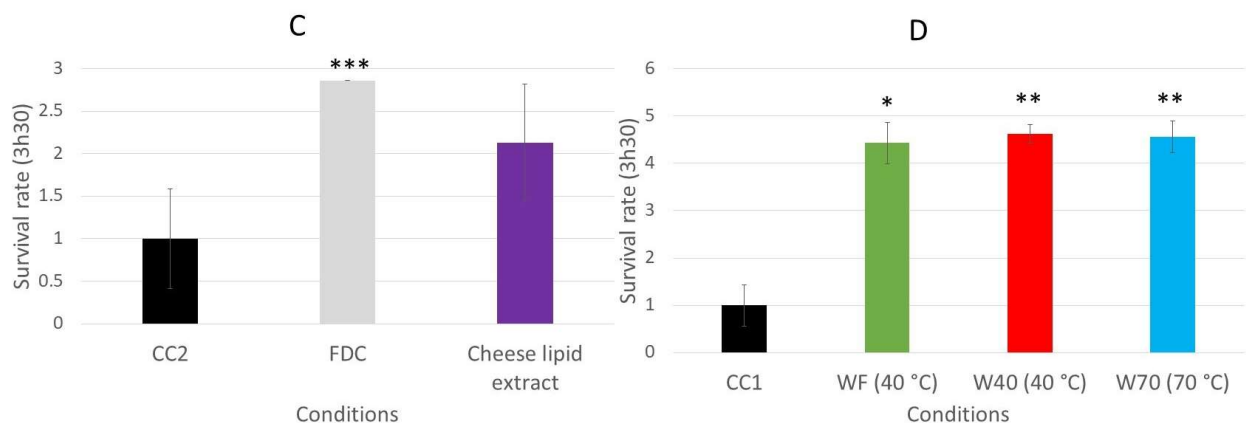
The increase of the survival rate of the worms, induced by the dried cheese extracts, may be due to an activation of the signaling pathways involved in the defense mechanisms of the worms, such as the insulin-like pathway or the p38 mitogen activated protein kinase (p38 MAPK) [8,9,22]. The same survival assay was performed with mutants to determine if these

pathways are involved in the biological mechanism. The survival rate for the *C. elegans* GR1307 strain, which does not express *daf-16*, was determined by measuring the worm viability after 3 h 30 min of incubation on the oxidative medium. When incubated with the freeze-dried cheese (FDC) ( $p < 0.0001$ ), and the cheese extracts WF ( $p = 0.0057$ ), W40 ( $p = 0.0003$ ) and W70 ( $p = 0.0371$ ) (Figure 7A,B), the worms exhibited a significant resistance to the oxidative medium compared with that in their respective control conditions. The FDC increased the survival rate from 1 to 4.8. The worms incubated with WF, W40 and W70 had a survival rate between 3.5 and 4.7. The cheese-lipid extract tended to improve the worms' resistance to the oxidative medium from 1 to 2.9. However, this increase was not significant compared with that in the CC2 group. The results suggested that only the cheese-lipid extract required the presence of the protein DAF-16 to improve the survival rate of the worms.

### GR1307 mutant strain



### IG10 mutant strain

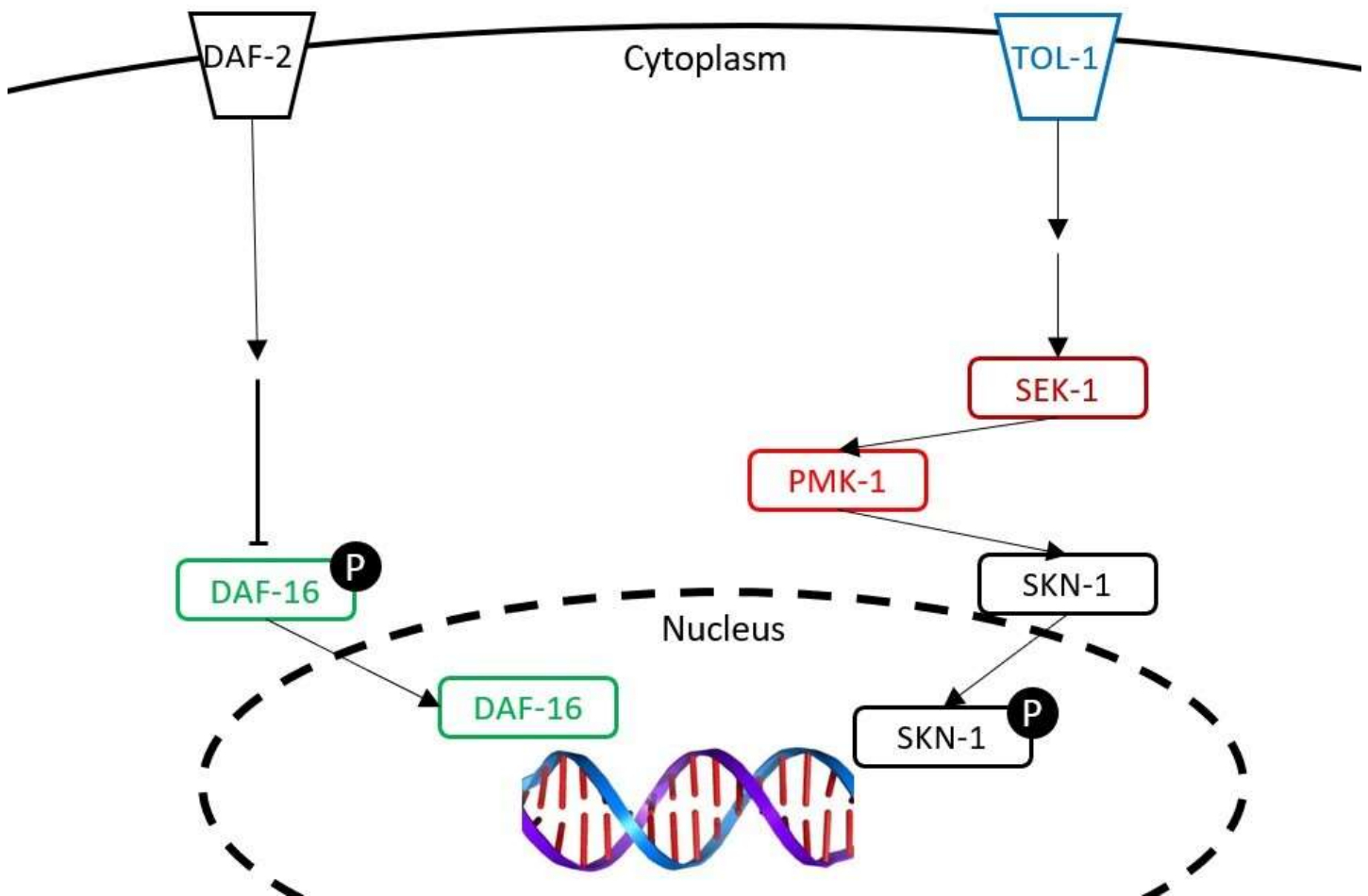


**Figure 7.** The relative survival rates of the *C. elegans* GR1307 strain (DAF-16 loss-of-function) (A,B) and IG10 strain (TOL-1 loss-of-function) (C,D) on an oxidative medium after 5 days of incubation on a medium supplemented with the cheese extracts (FDC (freeze-dried cheese), cheese-lipid extract and aqueous extracts WF, W40 and W70). The conditions were considered significantly different from the control when the  $p$ -value was lower than 0.05 (\*), 0.01 (\*\*), 0.001 (\*\*\*) or 0.0001 (\*\*\*\*) (Kruskal–Wallis test).

The same experiment was conducted with the *C. elegans* IG10 strain, which does not express the gene of the receptor *tol-1* that is linked to the p38 MAPK signaling pathways involved in the nematode immunity. The absence of the receptor may prevent the activation of the pathway by the extracts and cancel the beneficial effects observed with the N2 strain. The same observations as for the GR1307 strain were made for the IG10 mutant. The worms incubated on the FDC or the dried aqueous extracts (W40, W70, WF) demonstrated a better resistance to the oxidizing medium ([Figure 7C,D](#)). The survival rate increased from 1 to 4.4 ( $p = 0.0162$ ) for WF and 4.6 ( $p = 0.0037$ ) for W40 and W70. For the FDC, it increased from 1 to 2.9 ( $p = 0.0005$ ). Once again, the cheese-lipid extract tended to increase the worms' resistance to the oxidative medium (survival rate of 2.1), but the effect observed was not significant in comparison with the CC2 condition. Based on these observations, only the cheese-lipid extract required the receptor TOL-1 in order to improve the survival rate of the worms.

### 3.5. Evaluation of the Expression of the Genes of Interest (GOI) *daf-16*, *sek-1* and *pmk-1*

The expression of the three genes of interest (*daf-16*, *sek-1* and *pmk-1*) was investigated as two of these are implicated in the p38 MAPK pathway ([Figure 8](#)). The experiment was conducted during two different time periods: 3 days and 10 days of incubation with the dried cheese extracts. The freeze-dried cheese (FDC) and the cheese-lipid extract did not modulate the expression of any of the genes of interest after 3 days of incubation ([Table 5](#)). At 10 days, the FDC significantly upregulated the expression of the three genes to 2.78 for *daf-16* ( $p = 0.0039$ ), 2.89 for *sek-1* ( $p = 0.0297$ ) and 2.80 for *pmk-1* ( $p = 0.016$ ). The cheese-lipid extract upregulated the expression of *daf-16* and *pmk-1* to 3.41 ( $p = 0.0019$ ) and 2.39 ( $p = 0.0094$ ), respectively, after 10 days of incubation ([Table 5](#)).



**Figure 8.** The representation of the insulin-like pathway and the p38 MAPK pathway studied in this article. The following genes were tested: *daf-16* (studied with a mutant and a transcriptomic analysis), *tol-1* (studied with a mutant), and *pmk-1* and *sek-1* (studied with a transcriptomic analysis).

With regard to the different dried aqueous extracts, at 3 days, only the extract WF overexpressed *daf-16* up to 5.52 ( $p = 0.0018$ ) before going back to a normal expression after 10 days. The expression of *sek-1* and *pmk-1* was not modified by the extract whatever the duration. As for W40, the results demonstrated that the extracts did not modulate the expression of the genes after 3 days of incubation (Table 6). At 10 days, W40 significantly increased the expression of *daf-16* to 2.93 ( $p = 0.0043$ ) and tended to overexpress *sek-1* to 3.39. Finally, the extract W70 did not influence the expression of the three genes of interest. The results demonstrated that, except for W70, the extracts influenced the expression of *daf-16*. Concerning the genes *sek-1* and *pmk-1*, only the FDC and the cheese-lipid extract were able to overexpress at least one of them.

**Table 5.** The relative expression of the three *C. elegans* genes of interest after 3 days or 10 days of incubation on a medium supplemented with FDC (freeze-dried cheese) or cheese-lipid extract in comparison with CC2 condition. The expressions were considered significantly different when the *p*-value was lower than 0.05 (\*) or 0.01 (\*\*), and simultaneous when the expression change was of at least 2 times higher or 0.5 times lower.

Conditions	Genes of Interest		
	<i>daf-16</i>	<i>sek-1</i>	<i>pmk-1</i>
FDC 3 days	1.95	1.13	1.00
FDC 10 days	2.78 **	2.89 *	2.80 *
Cheese-lipid extract 3 days	1.07	1.02	1.09
Cheese-lipid extract 10 days	3.41 **	1.19	2.39 **

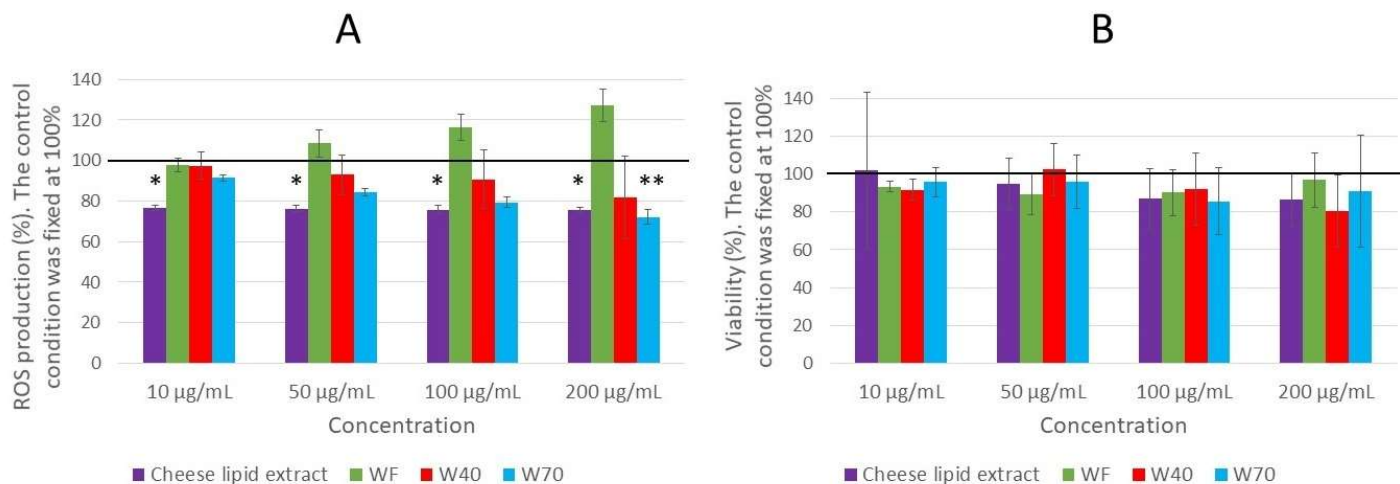
**Table 6.** The relative expression of the three *C. elegans* genes of interest after 3 days or 10 days of incubation on a medium supplemented with aqueous extracts WF, W40 or W70, in comparison with CC1 condition. The expressions were considered significantly different when the *p*-value was lower than 0.01 (\*\*), and simultaneous when the expression change was of at least 2 times higher or 0.5 times lower.

Conditions	Genes of Interest		
	<i>daf-16</i>	<i>sek-1</i>	<i>pmk-1</i>
WF (40 °C) 3 days	5.52 **	1.11	1.27
WF (40 °C) 10 days	1.00	1.87	1.01
W40 (40 °C) 3 days	1.08	0.83	1.24
W40 (40 °C) 10 days	2.93 **	3.39	0.67
W70 (70 °C) 3 days	1.20	0.80	1.08
W70 (70 °C) 10 days	1.96	1.26	0.59

### 3.6. Production of ROS in Human Blood Leukocytes Triggered by PMA

The effect of the dried cheese extracts (cheese-lipid extract, WF, W40 and W70) on the production of the reactive oxygen species (ROS) was quantified in human blood leukocytes triggered by PMA (Figure 9A). Only two extracts exhibited the capacity to reduce the ROS production in the cells. A significant decrease was observed for W70 for the highest concentration (200 µg/mL), decreasing the ROS production by 28% ( $p = 0.0029$ ). The other concentrations also tended to decrease the ROS production, but not significantly. Finally, the cheese-lipid extract significantly reduced the production of ROS for each concentration, with the same strength as no dose response was observed (by 23% for 10 µg/mL ( $p = 0.025$ ) and by 24% for

50 µg/mL ( $p = 0.0202$ ), 100 µg/mL and 200 µg/mL ( $p = 0.0124$  for both concentrations)). The results obtained were not influenced by any toxic effects of the extracts, as no significant differences were observed with the leukocyte viability assay (Figure 9B).



**Figure 9.** The effect of the cheese-lipid extract, WF, W40 and W70 on the ROS production in the leukocytes (A) and the viability of the leukocytes (B). The cells were treated with the indicated concentrations of the extract for 2 h, and measurements were made every 30 min. Data were expressed as relative production or viability in comparison with the control which was fixed at 100%. The conditions were considered significantly different from the control when the  $p$ -value was lower than 0.05 (\*), 0.01 (\*\*). (Kruskal–Wallis test).

### 3.7. Effect of the Dried Milk Extracts on the Longevity of Wild-Type *C. elegans* N2 Strain and Its Survival Rate on the Oxidative Medium

In order to determine if the milk could provide the same beneficial effect on the worms' longevity as the cheese, a longevity assay was conducted with the dried milk extracts, using the wild-type *C. elegans* N2 strain. Indeed, the milk used for making the cheese could contain the same metabolites and so, could exert the same beneficial effect.

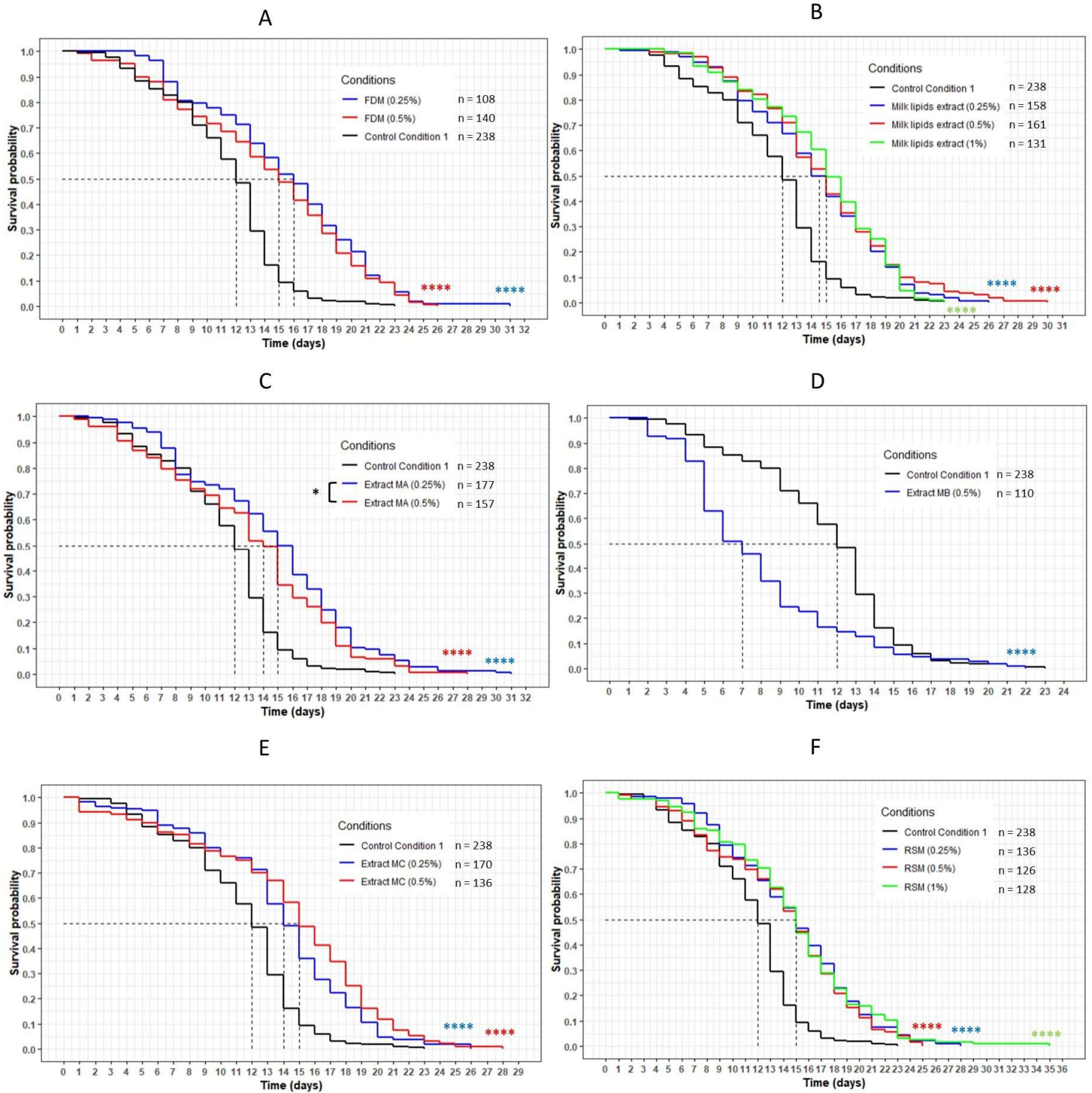
Incubating the worms with the freeze-dried milk (FDM) showed a significant increase in longevity for both concentrations tested ( $p < 0.0001$ ) (Figure 10). The mean lifespan increased by 33% and 25% for the 0.25% and 0.5% concentrations, respectively (Table 7). The maximum lifespan also increased from 23 days (maximum lifespan of CC1) to 31 days (+35%) and 26 days (+13%), and the percentage of the population still alive when the worms on the CC1 condition had died was 6% and 5%, respectively. Moreover, no differences were observed between the two concentrations of FDM when compared to each other. The same observation was made for the milk lipid extract, the milk extracts MA (obtained with dichloromethane) and MC (obtained with ethanol) and the residual solid milk (RSM). Indeed, these conditions also significantly



increased the lifespan of the worms ( $p < 0.0001$ ). The mean lifespan increased between 21% and 25% for all conditions, and the percentage of the population still alive at 23 days reached a maximum of 5%. The maximum lifespan was more variable, with an increase of up to 52% with the RSM compared to the CC1 condition. Concerning the extract MA, a significant difference was observed between the two concentration curves ( $p = 0.04$ ), with the 0.25% curve above the 0.5% concentration curve.

**Table 7.** Data of the longevity assay of the wild-type *C. elegans* N2 strain on the medium supplemented with the FDM (freeze-dried milk), milk lipid extract, extracts MA (obtained with dichloromethane), MB (obtained with ethyl acetate), MC (obtained with absolute ethanol) and the RSM (residual solid milk), and CC1 as a control. Mean lifespan, maximum lifespan and the percentage of the population still alive are from the survival curves.  $p$ -values were calculated by comparing conditions with the CC1 using the log-rank test.

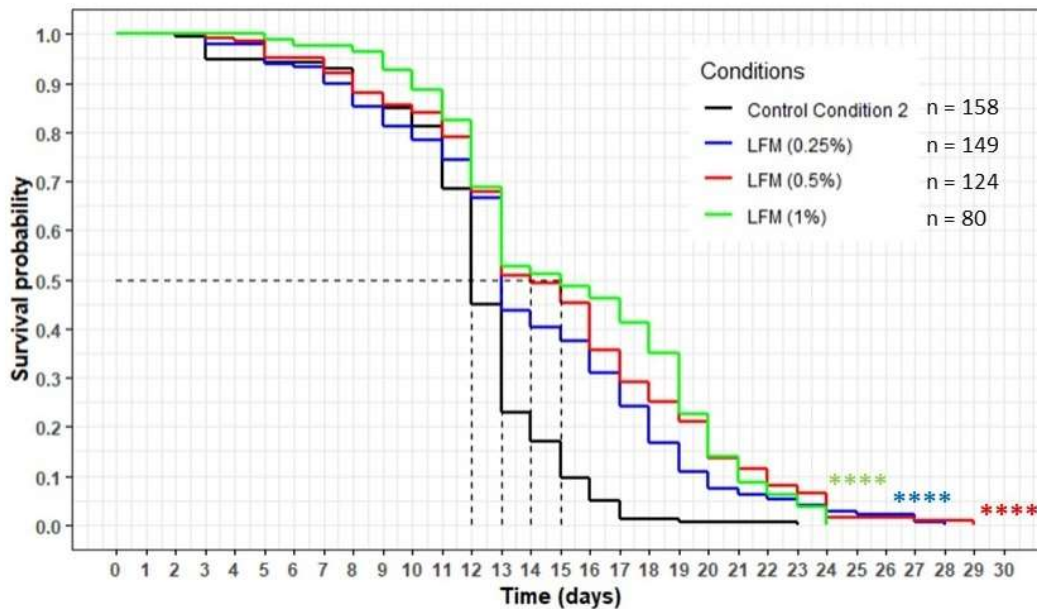
Tested Conditions	Concentration (w/v) (%)	Mean Lifespan (Days)	Maximum Lifespan (Days)	Relative Increase of the Maximum Lifespan (%)	Percentage of Population Still Alive at 23 Days (%)	$p$ -Value
CC1	-	12	23	-	0	-
Freeze-Dried Milk (FDM)	0.25	16	31	+35	6	<0.0001
	0.5	15	26	+13	5	<0.0001
Milk Lipid Extract	0.25	14.5	26	+13	3	<0.0001
	0.5	15	30	+30	5	<0.0001
	1	15	23	0	0	<0.0001
Extract MA	0.25	15	31	+35	5	<0.0001
	0.5	14	28	+22	3	<0.0001
Extract MB	0.5	7	22	-4	0	<0.0001
Extract MC	0.25	14	26	+13	2	<0.0001
	0.5	15	28	+22	4	<0.0001
Residual Solid Milk (RSM)	0.25	15	28	+22	5	<0.0001
	0.5	15	25	+9	5	<0.0001
	1	15	35	+52	4	<0.0001



**Figure 10.** The influence of FDM (freeze-dried milk) (A), milk lipid extract (B), extracts MA (obtained with dichloromethane) (C), MB (obtained with ethyl acetate) (D), MC (obtained with ethanol) (E) and RSM (residual solid milk) (F) on the lifespan of wild-type *C. elegans* N2 strain. The worms were incubated on the medium supplemented with the dried extracts at day 0 and regularly fed with HK *E. coli* OP50. The conditions were considered significantly different when the *p*-value was lower than 0.05 (\*) or 0.0001 (\*\*\*). The asterisks next to the curves represent the differences with the control condition CC1. The asterisks next to the legend represent the differences between the extracts (log-rank test).

The extract MB, unlike the others, exhibited a significant negative effect on the lifespan of the wild-type *C. elegans* N2 strain. Indeed, the curve representing this extract was significantly below the CC1 curve ( $p < 0.0001$ ) (Figure 10). The mean lifespan was reduced by 42% and the maximum lifespan was lower than the control, with a maximum of 22 days against 23 days (-4%) (Table 7).

The worms incubated with the lipid-free milk (LFM) presented a significant increase in their lifespan compared with the CC2 condition, with the curves of each concentration of the extract above the CC2 curve ( $p < 0.0001$ ) (Figure 11). The mean lifespan increased by 8%, 17% and 25% for the 0.25%, 0.5% and 1% concentrations, respectively (Table 8). The maximum lifespan increased between 4% and 26%, and the percentage of the population still alive when the worms on the CC2 condition had died was between 5% and 7%.



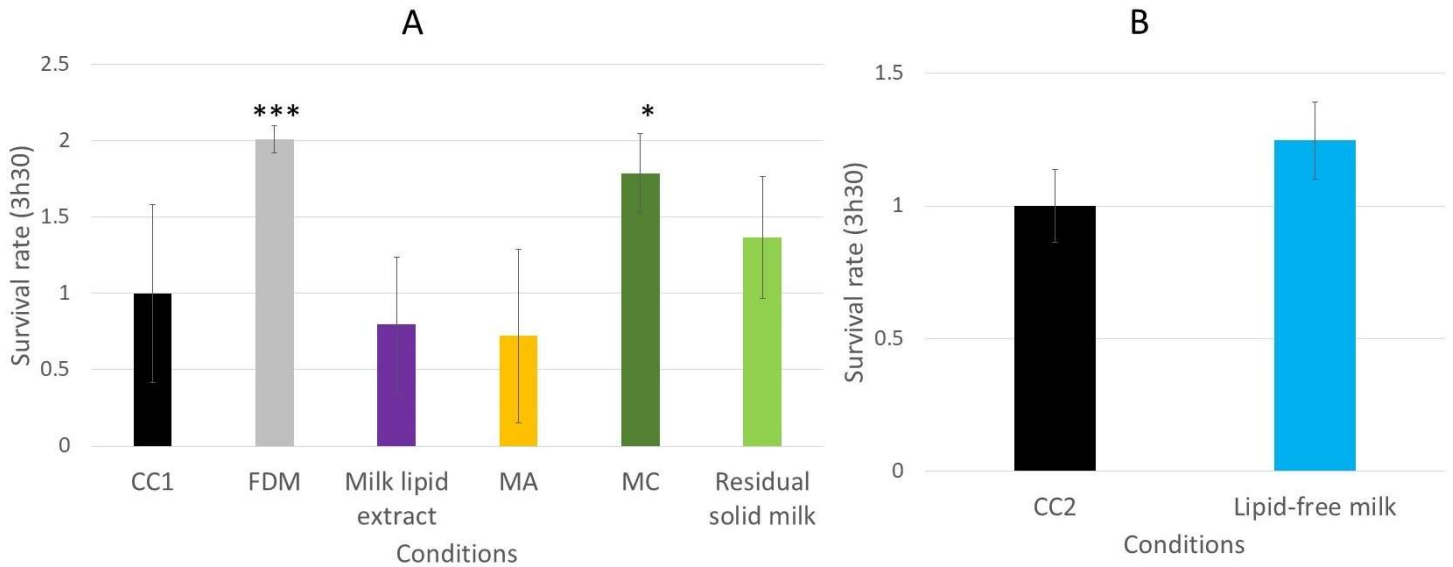
**Figure 11.** The influence of the LFM (lipid-free milk) on the lifespan of the wild-type *C. elegans* N2 strain. The worms were incubated on the medium supplemented with the dried extract at day 0 and regularly fed with HK *E. coli* OP50. The conditions were considered significantly different from the control conditions CC2 when the  $p$ -value was lower than 0.0001 (\*\*\*\*) (log-rank test).

**Table 8.** Data of the longevity assay of the wild-type *C. elegans* N2 strain on the medium supplemented with the LFM (lipid-free milk) and CC2 as a control. Mean lifespan, maximum lifespan and the percentage of population still alive are from survival curves. *p*-values were calculated by comparing conditions with CC2 using the log-rank test.

Tested Conditions	Concentration (w/v) (%)	Mean Lifespan (Days)	Maximum Lifespan (Days)	Relative Increase of the Maximum Lifespan (%)	Percentage of Population Still Alive at 23 Days (%)	<i>p</i> -Value
CC2	-	12	23	-	0	-
Lipid-Free Milk (LFM)	0.25	13	28	+22	5	<0.0001
	0.5	14	29	+26	7	<0.0001
	1	15	24	+4	5	<0.0001

The effects of the milk extracts on the survival abilities of the worms on the oxidative medium were also evaluated. Only the worms incubated with the FDM and the extract MC exhibited a better resistance to the oxidizing medium compared to the CC1 condition ([Figure 12A](#)), with a survival rate increasing from 1.0 for the CC1 to 2.0 ( $p = 0.0006$ ) and 1.8 ( $p = 0.0142$ ), respectively. The other extracts did not show any significant effect on the survival of the worms

With the exception of the extract MB, the results of our lifespan assay demonstrated that all of the other milk extracts (FDM, milk lipid extract, MA, MC, RSM and LFM) exerted a beneficial effect and were able to significantly increase the lifespan of the worms. However, in the survival assay on the oxidative medium, the effects of these extracts, still excepting MB, on the worms' survival rate were not as noteworthy as those of the cheese extracts (FDC, cheese-lipid extract, WF, W40, W70). Indeed, only two milk extracts (FDM and MC) exhibited an effect on the worms.



**Figure 12.** The relative survival rates of the wild-type *C. elegans* N2 strain on an oxidative medium after 5 days of incubation on a medium supplemented with FDM (freeze-dried milk), milk lipid extract, extract MA (obtained with dichloromethane), MC (obtained with ethanol) and RSM (residual solid milk) (A) or LFM (lipid-free milk) (B). The conditions were considered significantly different from the control when the *p*-value was lower than 0.05 (\*) or 0.001 (\*\*\*) (Kruskal–Wallis test).

## 4. Discussion

### 4.1. The Transcription Factor DAF-16 is Implicated in the Mechanism by Which the Dried Cheese Extracts Increase Longevity

In our previous study, we demonstrated the beneficial effects of different dried cheese extracts (the freeze-dried cheese (FDC), the cheese-lipid extract and the three cheese extracts obtained with water) on nematode longevity [4]. To better understand the mechanisms of action, the present study was focused on the identification of the signaling pathways that may be involved in these beneficial effects. *C. elegans* has already been the subject of many investigations and is now well described [23]. The insulin-like pathway, also named DAF-2/DAF-16, has been reported to be involved in the development and in the longevity phenomenon of the worm [11,24]. Many studies have highlighted that the transcription factor DAF-16 regulates the lifespan by influencing downstream genes [10,11]. As our extracts were shown to increase longevity, an assumption was established that DAF-16 was associated with this phenomenon. Two experiments were performed to determine the involvement of DAF-16: a lifespan assay with the GR1307 mutant strain that does not express DAF-16 and the study of the cellular

localization of DAF-16 with the transgenic strain TJ356 expressing DAF-16::GFP. These assays were completed with a transcriptomic analysis to determine the expression of *daf-16* when the worms were incubated with the extracts.

It has been shown that the FDC significantly increased the lifespan of the wild-type *C. elegans* N2 strain. The longevity assay on the DAF-16 loss-of-function strain (GR1307) showed a difference in the effect of the cheese, with a disappearance of the beneficial effects. There was no variation in the mean and maximum lifespan of the worms incubated with FDC compared with the CC2 worms. The results demonstrated that FDC cannot increase longevity without DAF-16. However, for both concentrations, the FDC curve was significantly above the CC2 curve, suggesting that the FDC exercised a beneficial effect on the worms, allowing a larger part of the population to remain alive for a given amount of time compared with the CC2 condition. The hypothesis of the implication of DAF-16 was also consolidated by the observations of the cellular localization of DAF-16::GFP ([Figure 5](#)) and the analysis of gene expression. Both experiments validated the implication of DAF-16. The FDC tended to translocate the transcription factor into the nuclei after 2 h of incubation. The gene expression analysis showed that the FDC significantly upregulated the expression of *daf-16* at 10 days. All results validated the implication of the DAF-16 transcription factor in the mechanisms of action of the FDC in increasing the lifespan of the nematode.

The cheese-lipid extract presented a dose effect during the longevity assay. A significant increase in longevity was only observed for the 0.5% ( $p = 0.02$ ). The study of the DAF-16::GFP consolidated the observation made during the longevity assay, as well as the RT-qPCR analysis, for which the extract significantly overexpressed *daf-16* at 10 days. These results validated the implication of the transcription factor DAF-16 in the mechanisms of action of the extract in increasing the longevity in the wild-type *C. elegans* N2 strain.

The monitoring of the cellular localization of DAF-16::GFP showed that the extracts W40 and WF tended to activate the signaling pathway by translocating the protein into the nuclei. The transcriptomic analysis consolidated this observation for WF and W40 which significantly up-regulated the expression of the gene at 3 days and at 10 days, respectively. These observations were reinforced by the inability of the extracts to increase the longevity of the GR1307 strain (DAF-16 loss-of-function). Even more, the curves representing the extracts were significantly below the CC1 curve (for both concentrations), suggesting that the transcription factor is necessary and required for WF and W40 to exhibit a beneficial effect. Concerning W70, no differences were observed with the CC1 condition for either concentration. Although W70 did

not overexpress the gene *daf-16*, it tended to translocate the transcription factor into the nuclei. In agreement with the observation made on the wild-type *C. elegans* N2 strain the extract did not show any toxic effect on the worms. All the results obtained validated the hypothesis that the DAF-16 transcription factor is involved in the biological mechanism, allowing the longevity of the nematode to increase when incubated with the extracts. The proof of the implication of DAF-16 completes the results obtained in the previous study [4], by characterizing the mechanisms of action of the extract.

As DAF-2/DAF-16 pathway is a homologue of the insulin pathway in human, it is conceivable that the effects of the bioactive extracts on the *C. elegans* model may be similar in humans, using the same pathway. Further studies are required to investigate this hypothesis.

#### *4.2. The Dried Cheese Extracts Influenced the Survival of the Worms on the Oxidative Medium*

During aging, the defense mechanisms of the worms are weakened, making the nematode more sensitive to the oxidative stress [9]. The beneficial effects of the dried cheese extracts observed in longevity may be due to an improvement of the worms' resistance to the oxidative stress and/or to the interaction with the DAF-16 transcription factor. To test this assumption, the effect of the extracts on the survival rate of the worms on the oxidative medium was evaluated.

The assay demonstrated that the worms incubated with the dried cheese extracts exhibited a better resistance to the oxidative medium, with an increase in the survival rate of up to 4.4 (Figure 6). Following these observations, the investigation of the signaling pathways implicated in the mechanisms of action was performed with the GR1307 (which does not express DAF-16) and IG10 (which does not express the receptor TOL-1) mutant strains. The insulin-like pathway is also described to be involved in immunity and stress resistance [22,25]. The results of the longevity assays suggested that DAF-16 is implicated in the beneficial effect of the extracts. The same survival assay on an oxidative medium was performed with the GR1307 strain. In absence of the protein DAF-16, no variation in the effect of the cheese extracts was observed in the worms, as evidenced by the survival rates, except for the cheese-lipid extract for which the increased survival rate was not significant compared with the control. This extract requires the expression of the protein DAF-16 to exhibit an improvement in the worms' resistance to the oxidative stress.

Another signaling pathway was investigated to describe the mechanisms of action of the cheese extracts. The p38 MAPK is a pathway involved in the human immune system [26]. This pathway is highly conserved in *C. elegans*, and is also implicated in the worms' resistance to oxidative stress by the synthesis of glutathione [8,22,27]. The receptor TOL-1, which is connected to the p38 MAPK, is a homolog of the toll-like receptor family in humans, which is implicated in immunity [9] and may play a role in the effect of the extracts. The survival assay on the oxidative medium performed with the TOL-1-deficient mutant strain showed the same results as the GR1307 strain. Indeed, the lipid extract alone could not significantly increase the survival rate of the worms without the presence of TOL-1, suggesting that the lipid extract also needs the p38 MAPK as well to exert its effect. The transcriptomic analysis revealed that the expression of two downstream genes of the p38 MAPK pathway, *sek-1* and *pmk-1*, was modulated by some cheese extracts. The FDC significantly upregulated *sek-1* and *pmk-1*, and the cheese-lipid extract, only influenced the expression of *pmk-1*, suggesting that the two extracts exert an effect via the p38 MAPK signaling pathway. These results suggest that the cheese-lipid extract requires the activation of the two signaling pathways to improve the resistance of the worms. With regard to WF, W40 and W70, they did not influence the expression of these genes. The results from the assays suggest that they may use another pathway for increasing the survival rate of the worms. Further mechanistic studies are needed to better understand their mechanisms of action.

#### 4.3. Influence of the Dried Cheese Extracts on ROS Production in Human Leukocytes

The FDC (freeze-dried cheese), the cheese-lipid extract and the cheese extracts WF, W40 and W70 demonstrated the ability to increase the longevity of the wild-type *C. elegans* N2 strain, as well as its survival rate on an oxidative medium, suggesting an action on the worms' resistance to the oxidative stress. In keeping with the investigation of the effects of the extract on this stress, an in vitro assay was conducted to determine the capacity of four extracts (cheese-lipid extract, WF, W40 and W70) to reduce the ROS production in human leukocytes. Only two extracts reduced the amount of ROS produced by the cells when triggered with PMA. The cheese-lipid extract seemed to exhibit an effect without any dose response, suggesting that the maximum efficient concentration was reached. Further studies with lower concentrations should give more information on the activity of the cheese-lipid extract on the ROS production. Conversely, the extract W70 only demonstrated a beneficial effect for the highest concentration (200 µg/mL). For the lower concentrations, the extract tended to decrease the ROS production



but without significant differences, suggesting that the effect of W70 increased with the concentration. This assay allowed us to make the correlation between the findings observed in *C. elegans* and in humans. The two effective extracts were able to improve the resistance of the worms to the oxidative medium and to reduce the ROS production in the human lymphocyte cells. Further studies are required in order to determine if the mechanisms of action involved in human cells are similar to those in *C. elegans*.

#### 4.4. The Milk and its Extracts Exert a Lower Beneficial Effect on the Wild-Type *C. elegans* N2 Strain Compared with the Cheese and its Extracts

The goal of this assay was to determine if the milk could exert the same effect as the cheese on the longevity and survival rate of the *C. elegans*. The results suggested that, except for the extract MB (obtained with ethyl acetate as a solvent), all of the dried milk extracts significantly increased the longevity of the wild-type *C. elegans* N2 strain. However, this beneficial effect seems lower in comparison with the effect of the dried cheese extracts as determined in our previous study [4]. Indeed, the comparison between the milk extracts and the equivalent cheese extracts, at the same concentration, revealed that milk was less efficient in improving the longevity of the nematode *C. elegans* than the cheese. The increase of the mean lifespan was higher with the freeze-dried milk (FDM) at 0.5% than the freeze-dried cheese (FDC) at 0.5% (+25% for the FDM and +18% for the FDC), but the maximum lifespan was lower. The FDM increased the maximum lifespan by 13%, whereas the FDC increased it by 63% at the same concentration. Moreover, the part of population still alive on the conditions, when the worms of the control had died, was higher with the FDC, with a maximum of 13% of the population still alive, whereas only a maximum of 5% was observed with the worms on the FDM. The same observation was made when the cheese-lipid extract was compared to the milk-lipid extract: a mean lifespan higher with the milk-lipid extract (+30% against +18%, for the same 0.5% concentration) but the maximum lifespan was lower than the cheese-lipid extract (+30% against +37%, for the same 0.5% concentration). The differences observed in their biological response may be due to a variation in the metabolite composition and/or concentration between these two dairy foods, induced by the microorganism's activities (fermentation, etc.) of the milk during the cheese-making process. This observation was confirmed by the fact that the cheese extracts A (extracted with dichloromethane) and B (extracted with ethyl acetate) killed the worms instantly, whereas survival curves from the longevity study with the equivalent extracts of milk

(MA and MB) were recovered, confirming the variation in the metabolite composition, or their concentration, between the two dairy foods.

The same observations were noted in the survival assay on the oxidative medium. The results suggested that the milk extracts were less beneficial than the cheese extracts. Indeed, only two milk extracts (freeze-dried milk (FDM) and extract MC) improved the survival of the worms, whereas the five cheese extracts (FDC, cheese-lipid extract, WF, W40 and W70) exerted a beneficial effect on the wild-type *C. elegans* N2 strain. Moreover, the survival rate was higher for the worms incubated with the cheese extracts. The survival assay on the oxidative medium, as well as the longevity assay, validated that the milk extracts had a less favourable impact on the *C. elegans* nematode.

## 5. Conclusions

This study allowed us to deepen the understanding of the biological effects of dried cheese extracts on longevity and resistance to oxidative stress in *C. elegans*. To our knowledge, this investigation had never been performed. The study of the signaling pathways involved in the mechanisms of action of the cheese extracts revealed, for the first time, that the insulin-like pathway is implicated, via DAF-16, to increase longevity. The extracts also revealed the capacity to increase the survival rate of the worms that were incubated on an oxidative medium. However, no evidence of the implication of the DAF-2/DAF-16 and/or the p38 MAPK in this mechanism has been highlighted. Only the cheese-lipid extract seemed to require these two pathways to improve the worms' resistance. The beneficial effects of the cheese extracts on the wild-type *C. elegans* N2 strain were correlated with their effect in human leukocytes. Indeed, two extracts (cheese-lipid extract and W70) decreased the ROS production, confirming the link between the results obtained with the nematode and human cells. These results allow us to hypothesize that the benefits of the raw-milk cheese could be similar in the aging process in humans. However, further studies on human cells are needed to pursue the investigation of the action of the extracts and understand the mechanisms implied in this phenomenon. Finally, the comparison of the effects of the milk and cheese extracts on longevity and the survival rate of the worms demonstrated a less favourable effect of the milk compared with the cheese, suggesting that the bioactive metabolites were only present, or were at a higher concentration, in the fermented food. The investigation of the bioactive metabolites in the goat cheese should continue, by subfractionating the interesting extracts and evaluating the biological effects of the resulting subfractions on the *C. elegans* and human cells in order to deepen our knowledge of

the biological activity of the cheese. Alongside, a comparison of the beneficial effects of the goat cheese from this study and other raw-milk cheeses should give more information regarding the bioactive metabolites in cheese and its potential applications concerning human health.

**Author Contributions:** Conceptualization, G.C., P.C., S.B. and L.R.; methodology, G.C., I.R., C.P., M.B., P.V., P.C., S.B. and L.R.; validation, I.R., P.C., S.B. and L.R.; formal analysis, G.C.; investigation, G.C., C.P., M.B. and P.V.; data curation, G.C.; writing—original draft preparation, G.C.; writing—review and editing, I.R., C.P., M.B., P.V., P.C., J.P., S.B. and L.R.; supervision, P.C., A.C., E.S., J.P., S.B. and L.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by VetAgro Sup by way of grants to G.C. Dômes Pharma provided support in the form of salaries for authors A.C., E.S. and J.P. Dômes Pharma also contributed by providing research materials for this study.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within this manuscript.

**Conflicts of Interest:** The funders (VetAgro Sup and Dômes Pharma) 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

- Phelan, M.; Kerins, D. The potential role of milk-derived peptides in cardiovascular disease. *Food Funct.* **2011**, *2*, 153–167.
- Muro Urista, C.; Álvarez Fernández, R.; Riera Rodríguez, F.; Arana Cuenca, A.; Téllez Jurado, A. Review: Production and functionality of active peptides from milk. *Food Sci. Technol. Int.* **2011**, *17*, 293–317.
- Yasuda, S.; Kuwata, H.; Kawamoto, K.; Shirakawa, J.; Atobe, S.; Hoshi, Y.; Yamasaki, M.; Nishiyama, K.; Tachibana, H.; Yamada, K.; et al. Effect of highly lipolyzed goat cheese on HL-60 human leukemia cells: Antiproliferative activity and induction of apoptotic DNA damage. *J. Dairy Sci.* **2012**, *95*, 2248–2260.
- Cardin, G.; Ripoché, I.; Poupet, C.; Bonnet, M.; Veisseire, P.; Chalard, P.; Chauder, A.; Saunier, E.; Priam, J.; Bornes, S.; et al. Development of an innovative methodology combining chemical fractionation and in vivo analysis to investigate the biological properties of cheese. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0242370.
- Wilson, M.A.; Shukitt-Hale, B.; Kalt, W.; Ingram, D.K.; Joseph, J.A.; Wolkow, C.A. Blueberry polyphenols increase lifespan and thermotolerance in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* **2006**, *5*, 59–68.
- Clark, L.C.; Hodgkin, J. Commensals, probiotics and pathogens in the *Caenorhabditis elegans* model. *Cell. Microbiol.* **2014**, *16*, 27–38.
- Park, M.R.; Yun, H.S.; Son, S.J.; 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*, 6828–6834.
- Poupet, C.; Chassard, C.; Nivoliez, A.; Bornes, S. *Caenorhabditis elegans*, a host to reveal and investigate the probiotic properties of beneficial microorganisms. *Front. Nutr.* **2020**, *7*, 135.
- Roselli, M.; Schifano, E.; Guantario, B.; Zinno, P.; Uccelletti, D.; Devirgiliis, C. *Caenorhabditis Elegans* and Probiotics Interactions from a Prolongevity Perspective. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1–14.
- Murphy, C.T.; McCarroll, S.A.; Bargmann, C.I.; Fraser, A.; Kamath, R.S.; Ahringer, J.; Li, H.; Kenyon, C. Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **2003**, *424*, 277–284.
- Lee, S.S.; Kennedy, S.; Tolonen, A.C.; Ruvkun, G. DAF-16 target genes that control *C. elegans* Life-span and metabolism. *Science (80-. )*. **2003**, *300*, 644–647.
- Kampkötter, A.; Pielarski, T.; Rohrig, R.; Timpel, C.; Chovolou, Y.; Wätjen, W.; Kahl, R. The Ginkgo biloba extract EGb761 reduces stress sensitivity, ROS accumulation and expression of catalase and glutathione S-transferase 4 in *Caenorhabditis elegans*. *Pharmacol. Res.* **2007**, *55*, 139–147.
- Brenner, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **1974**, *77*, 71–94.
- 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.
- Porta-de-la-Riva, M.; Fontrodona, L.; Villanueva, A.; Cerón, J. Basic *Caenorhabditis elegans* methods: Synchronization and observation. *J. Vis. Exp.* **2012**, e4019.

16. Breger, J.; Fuchs, B.B.; Aperis, G.; Moy, T.I.; Ausubel, F.M.; Mylonakis, E. Antifungal Chemical Compounds Identified Using a *C. elegans* Pathogenicity Assay. *PLoS Pathog.* **2007**, *3*, 168–178.
17. Fatima, S.; Haque, R.; Jadiya, P.; 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*, 1–16.
18. Grompone, G.; Martorell, P.; Llopis, S.; González, N.; Genovés, S.; Mulet, A.P.; Fernández-Calero, T.; Tiscornia, I.; Bollati-Fogolin, 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*, 1–13.
19. 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* Icr35® in the invertebrate model *Caenorhabditis elegans*: First mechanistic insights. *Microorganisms* **2020**, *8*, e52493.
20. 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*, 1–14.
21. Nakagawa, H.; Shiozaki, T.; Kobatake, E.; Hosoya, T.; Moriya, T.; Sakai, F.; Taru, H.; Miyazaki, T. Effects and mechanisms of longevity induced by *Lactobacillus gasseri* SBT2055 in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* **2016**, *15*, 227–236.
22. Millet, A.C.M.; Ewbank, J.J. Immunity in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Opin. Immunol.* **2004**, *16*, 4–9.
23. The *C. elegans* Sequencing Consortium Genome Sequence of the Nematode *C. elegans* : A Platform for Investigating Biology. *Science* **1998**, *282*, 2012–2018.
24. Finch, C.E.; Ruvkun, G. The genetics of aging. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **2001**, *2*, 435–462.
25. Kondo, M.; Yanase, S.; Ishii, T.; Hartman, P.S.; Matsumoto, K.; Ishii, N. The p38 signal transduction pathway participates in the oxidative stress-mediated translocation of DAF-16 to *Caenorhabditis elegans* nuclei. *Mech. Ageing Dev.* **2005**, *126*, 642–647.
26. Nakahara, T.; Moroi, Y.; Uchi, H.; Furue, M. Differential role of MAPK signaling in human dendritic cell maturation and Th1/Th2 engagement. *J. Dermatol. Sci.* **2006**, *42*, 1–11.
27. Pastuhov, S.I.; Hisamoto, N.; Matsumoto, K. MAP kinase cascades regulating axon regeneration in *C. elegans*. *Proc. Japan Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* **2015**, *91*, 63–75.

L'ensemble des travaux réalisés au cours de cette étude a permis de montrer :

- Que l'action bénéfique des extraits de fromage de chèvre sur la longévité du nématode fait intervenir le facteur de transcription DAF-16.
- Que les extraits issus du fromage de chèvre permettent de protéger le nématode en condition de stress oxydant. Parmi les 5 extraits testés, seule l'action de l'extrait apolaire semble faire intervenir le facteur de transcription DAF-16 et le récepteur TOL-1 de la voie p38 MAPK. Aussi, 2 de ces extraits (extrait apolaire et un des trois extraits aqueux) induisent une diminution de la production de radicaux libres sur un modèle *in vitro* de leucocytes humains stimulés avec du PMA.
- Que la bioactivité est portée par les métabolites présents spécifiquement dans le fromage (étant donné que les extraits de lait de chèvre ont moins d'impacts bénéfiques sur *C. elegans* en comparaison aux mêmes types d'extraits issus du fromage).

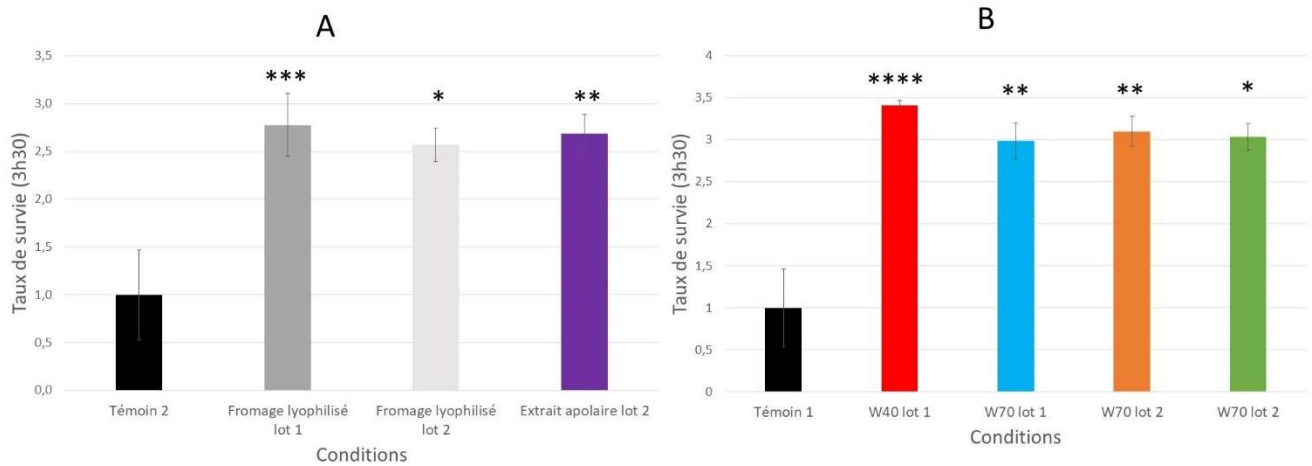
Comme précisé dans l'article, la méthode d'extraction présentée dans le premier chapitre a été appliquée sur le lait de chèvre pour obtenir les différents extraits. De la même manière que pour le fromage, chaque extrait de lait était obtenu à la suite de trois étapes de séparation (une extraction suivie de deux épuisements). Le rendement à chaque étape a été calculé afin d'évaluer l'efficacité de l'extraction pour chaque solvant ([Tableau 9](#)). Les rendements obtenus mettent en évidence qu'au moins 50 % de la matière à extraire l'a été lors de la première étape de séparation. Ces résultats mettent en évidence que la méthodologie d'extraction développée et validée pour des matrices fromagères (cf. article n°1) peut être utilisée dans les mêmes conditions lors de l'extraction de matrices laitières.

*Tableau 9 : Rendements des extraits de lait en pourcentage (extrait apolaire du lait, lait délipidé, extrait au dichlorométhane, extrait à l'acétate d'éthyle, extrait à l'éthanol et résidu du lait)*

Extrait de lait	Rendements (%)			Extrait final
	Étape de séparation 1	Étape de séparation 2	Étape de séparation 3	
Extrait apolaire du lait	23.4	1.1	0.1	24.8
Lait délipidé	-	-	-	69.7
Extrait au dichlorométhane (MA)	0.3	0.1	0.1	0.5
Extrait à l'acétate d'éthyle (MB)	< 0.1	< 0.1	< 0.1	0.1
Extrait à l'éthanol (MC)	0.5	0.3	0.2	1.0
Résidu du lait	-	-	-	62.3

*Ces rendements sont calculés à partir de la quantité de matières sèches récupérées à la fin de chaque étape de séparation.*

L'ensemble des travaux de recherche réalisés avec les extraits de fromage de chèvre l'a été à partir de fromages issus d'un même lot de production. Afin de s'assurer que les effets biologiques observés ne sont pas « lot de production dépendant », les études de bioactivité ont été refaites avec des extraits issus de caillés lactiques de chèvres de différents lots de production (lots produits à 1 an d'intervalle) ([Figure 22](#)). Ces résultats attestent d'une répétabilité au niveau de l'effet des extraits de fromage sur la survie du ver en milieu oxydant : **i**) au sein d'un même lot de fromage ; **ii**) entre deux lots de fromages produits à un an d'intervalle. Cela valide donc la méthode d'extraction employée, et confirme la pertinence de travailler à partir de cette matrice fromagère.



*Figure 22* : Taux de survie relatif de la souche sauvage N2 de *C. elegans* en condition oxydante, après 5 jours d'incubation sur un milieu supplémenté avec fromage lyophilisé lot 1, fromage lyophilisé lot 2 et l'extrait apolaire lot 2 (A), ou l'extrait aqueux W40 lot 1, W70 lot 1, W40 lot 2 et W70 lot 2 (B).

*Les conditions sont considérées significativement différentes du témoin lorsque la p-value était inférieure à 0.05 (\*), 0.01 (\*\*), 0.001 (\*\*\*) ou 0.0001 (\*\*\*\*) (Test de Kruskal-Wallis)*

## **Chapitre 3 : Étude de la composition chimique de 4 extraits de fromages définis précédemment comme biologiquement actifs**

A la suite des travaux présentés dans les chapitres 1 et 2 de cette partie « Résultats » du manuscrit, nous avons choisi d'étudier la composition chimique de 4 extraits de fromage de chèvre définis comme biologiquement actifs : l'extrait apolaire et les 3 extraits aqueux. L'objectif de cette étude est d'obtenir un visuel exhaustif de la composition chimique de ces extraits et de réaliser une analyse comparative de ces différents profils. Notre volonté est, à terme, d'établir une liaison entre le profil chimique des extraits et leurs activités biologiques d'intérêt.

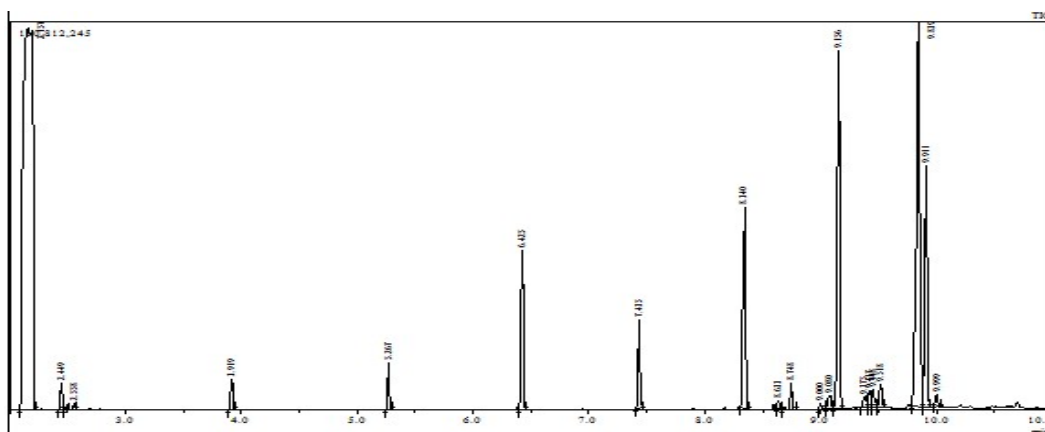
Les résultats obtenus précédemment montrent des disparités dans la réponse biologique des extraits. En effet, bien que 2 extraits aqueux (W40 et W70, Figure 20) induisent l'augmentation de la longévité du nématode, seul un des deux (W70) présente aussi la capacité de réduire la production de radicaux libres par les cellules leucocytaires humaines. Ces résultats suggèrent que l'extrait W70, contrairement à W40, renferme des métabolites actifs sur l'inhibition de la production de radicaux libres par ces cellules leucocytaires activées par du PMA. Afin de pouvoir déterminer ce(s) métabolite(s) actif(s), nous avons décidé d'analyser la composition chimique de nos extraits afin de pouvoir réaliser une analyse comparative des profils ainsi obtenus. La suite de ce chapitre présente les méthodes et outils développés pour analyser l'extrait apolaire et les extraits aqueux, ainsi que les résultats obtenus.

### **1. Analyse de la composition en acides gras de l'extrait apolaire de fromage de chèvre**

L'extrait apolaire est composé de l'ensemble des molécules apolaires (principalement des lipides) du fromage qui ont été extraites à l'aide du cyclohexane. Le fromage contenant une fraction lipidique importante (jusqu'à 40 % de la masse sèche du fromage), nous avons choisi de réaliser cette extraction afin de délipider le fromage pour faciliter les extractions suivantes et les futures analyses [181]. La richesse en lipides de cet extrait apolaire nous a conduit à déterminer son profil en acide gras. Pour cela, nous avons eu recours à une analyse par



chromatographie gazeuse, couplée à de la spectrométrie de masse (GC-MS, pour séparer les différents acides gras et pour accéder à leur masse). L'analyse étant réalisée en phase gazeuse, une étape de dérivation a été effectuée pour transformer les acides gras en esters afin de les rendre plus volatiles (protocole Partie 2, § 4.1.1) [182–184]. Le profil en esters d'acides gras de cet extrait est présenté sur le chromatogramme de la [Figure 23](#).



*Figure 23* : Chromatogramme des esters d'acide gras de l'extrait apolaire obtenu à la suite d'une analyse par GC-MS.

La méthode analytique employée (paramètres de l'analyse Partie 2, § 4.2.2) a permis d'effectuer une bonne séparation des signaux majoritaires observés. Elle reste cependant peu optimisée concernant les faibles signaux entre 8.5 et 10 minutes. Néanmoins, le chromatogramme obtenu est suffisant pour différencier les différents composés détectés en spectrométrie de masse. En comparant les signaux obtenus avec ceux de la base de données à disposition, il a été possible d'identifier plusieurs esters et de caractériser les acides gras présents dans notre extrait apolaire issu du fromage de chèvre ([Tableau 10](#), le pourcentage de concordance correspond au pourcentage de similitude entre le spectre de masse obtenu et celui de la base de données). L'analyse de ces résultats montre que 19 acides gras de masse différente ont pu être identifiés dans cet extrait apolaire (variant de 88 g/mol à 452 g/mol).

Tableau 10 : Attribution des signaux détectés dans l'extrait apolaire.

<u>Temps de rétention (min)</u>	<u>Composé identifié</u>	<u>Concordance (%)</u>	<u>Formule brute</u>
<u>2,449</u>	<u>Acide butanoïque</u>	<u>98</u>	<u>C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub></u>
<u>2,558</u>	<u>Ethylcyclopentane</u>	<u>97</u>	<u>C<sub>6</sub>H<sub>12</sub></u>
<u>3,919</u>	<u>Acide hexanoïque</u>	<u>96</u>	<u>C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub></u>
<u>5,267</u>	<u>Acide caprylique</u>	<u>96</u>	<u>C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub></u>
<u>6,425</u>	<u>Acide caprique</u>	<u>95</u>	<u>C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub></u>
<u>7,435</u>	<u>Acide laurique</u>	<u>97</u>	<u>C<sub>12</sub>H<sub>24</sub>O<sub>2</sub></u>
<u>8,340</u>	<u>Acide isomyristique</u>	<u>93</u>	<u>C<sub>14</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub></u>
<u>8,633</u>	<u>Acide sarcinique</u>	<u>95</u>	<u>C<sub>15</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub></u>
<u>8,748</u>	<u>Acide pentadécanoïque</u>	<u>97</u>	<u>C<sub>15</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub></u>
<u>9,000</u>	<u>Acide palmitique</u>	<u>94</u>	<u>C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub></u>
<u>9,08</u>	<u>Acide palmitoléique</u>	<u>95</u>	<u>C<sub>16</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub></u>
<u>9,156</u>	<u>Acide arachidique</u>	<u>85</u>	<u>C<sub>20</sub>H<sub>40</sub>O<sub>2</sub></u>
<u>9,375</u>	<u>Acide mélissique</u>	<u>90</u>	<u>C<sub>30</sub>H<sub>60</sub>O<sub>2</sub></u>
<u>9,417</u>	<u>Acide hénéicosanoïque</u>	<u>89</u>	<u>C<sub>21</sub>H<sub>42</sub>O<sub>2</sub></u>
<u>9,448</u>	<u>17-pentatriacontene</u>	<u>88</u>	<u>C<sub>35</sub>H<sub>70</sub></u>
<u>9,518</u>	<u>Acide 14-methyl-hexadécanoïque</u>	<u>95</u>	<u>C<sub>17</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub></u>
<u>9,839</u>	<u>Acide élaïdique</u>	<u>96</u>	<u>C<sub>18</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub></u>
<u>9,911</u>	<u>Acide stéarique</u>	<u>91</u>	<u>C<sub>18</sub>H<sub>36</sub>O<sub>2</sub></u>
<u>9,999</u>	<u>Acide linoléique</u>	<u>92</u>	<u>C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub></u>

*L'attribution a été réalisée par rapport à la base de données à disposition. Le pourcentage de concordance indique la similitude entre le spectre de masse issu de l'extrait et celui de la base de données.*

Ces travaux ont donc permis de déterminer la composition en acides gras de l'extrait apolaire issu du fromage de chèvre. Cependant, il serait nécessaire de poursuivre les études afin d'identifier la/les molécule(s) responsable(s) de l'activité biologique mise en évidence pour cet extrait lors des différents tests biologiques mis en œuvre. Pour réaliser cela, il est possible de fractionner l'extrait et d'évaluer l'activité biologique des différentes fractions obtenues. Étant donné que ces molécules ont une polarité très similaire, il sera difficile de les séparer en utilisant cette propriété. L'utilisation de techniques de séparations basées sur les différences de masse des molécules (par exemple, les Biobeads®) peut permettre de solutionner ce problème. Les différentes fractions ainsi obtenues devront, à leur tour, être testées selon les cribles biologiques adéquats afin de déterminer les fractions bioactives, de les sélectionner pour ensuite les sous-

fractionner jusqu'à pouvoir déterminer la/les molécule(s) responsable(s) des activités biologiques recherchées (démarche bioguidée).

## **2. Développement d'un outil d'analyse comparative des compositions des extraits non apolaires issus des fromages et du lait de chèvre**

Concernant les trois extraits aqueux issus du caillé lactique caprin définis précédemment comme biologiquement actifs : **i)** un premier a été obtenu par extraction à l'eau à 40°C sur le fromage lyophilisé délipidé ; **ii)** un second a été obtenu par extraction, à l'eau, à 70°C, du même fromage de chèvre lyophilisé et délipidé ; **iii)** un troisième a été obtenu en utilisant l'eau à 40 °C comme solvant lors de l'extraction fractionnée (Figure 20). La détermination de la composition chimique de ces 3 extraits aqueux est réalisée en mettant en œuvre une méthodologie de séparation par chromatographie liquide, couplée à une détection par spectrométrie de masse (LC-MS). Pour chacun des trois extraits, un profil chromatographique est ainsi obtenu. Une analyse comparative des profils chromatographiques de ces extraits permet ainsi de mettre en évidence les homologies et les différences concernant leur composition chimique. Chaque profil chromatographique étant la résultante de la présence de plusieurs milliers de molécules, une analyse comparative informatisée a donc dû être développée et mise en place. L'objectif final de ces analyses comparatives est d'arriver à déterminer plus aisément les molécules ou « groupes » de molécules susceptibles d'être porteuses des activités biologiques d'intérêt mises en évidence avec les tests biologiques sur le modèle *C. elegans*.

Dans ce cadre, l'analyse comparative n'ayant pas vraiment d'intérêt à être conduite sur seulement 3 extraits aqueux, l'ensemble des extraits non apolaires (issus des extractions de plusieurs lots de production du même type de caillé lactique caprin, mais aussi de l'extraction de lait de chèvre) réalisés au cours de ce travail de thèse ont été analysés chromatographiquement et leurs profils ont été comparés. Cela a donc concerné 18 extraits, comme définis ci-dessous et détaillés dans le [Tableau 11](#) :

Tableau 11 : Informations relatives à chaque extrait utilisé au cours de l'étude.

Nom d'extrait	Aliment	Lot de production	Solvant d'extraction	Température d'extraction	Extraction en parallèle	Procédé d'extraction
W40	Fromage	1	Eau	40 °C	-	II
W70	Fromage	1	Eau	70 °C	-	II
C-FL	Fromage	1	Ethanol absolue	20 °C	-	I
WF	Fromage	1	Eau	40 °C	-	I
W40 (2)	Fromage	2	Eau	40 °C	X	II
W70 (2)	Fromage	2	Eau	70 °C		II
C-FL (2)	Fromage	2	Ethanol absolue	20 °C	-	I
WF (2)	Fromage	2	Eau	40 °C	-	I
W40 (3)	Fromage	2	Eau	40 °C	X	II
W70 (3)	Fromage	2	Eau	70 °C		II
W40 (4)	Fromage	1'	Eau	40 °C	X	II
W70 (4)	Fromage	1'	Eau	70 °C		II
W40 (5)	Fromage	2'	Eau	40 °C	X	II
W70 (5)	Fromage	2'	Eau	70 °C		II
W40 (6)	Fromage	2'	Eau	40 °C	X	III
W70 (6)	Fromage	2'	Eau	70 °C		III
Résidu du lait	Lait	3	Résidu	-	-	-
Lait délipidé	Lait	3	Résidu	-	-	-

Lot : lot de fromage à partir duquel l'extraction a été réalisée (1 : Lot 1 (juin 2018) ; 2 : Lot 2 (juillet 2019) ; 1' et 2' correspondent aux fromages des lots 1 et 2, mais dont l'extraction a été réalisée plus de 6 mois après leur date d'achat. Extraction en parallèle : indique si deux extractions ont été réalisées en parallèle, dans les mêmes conditions (température ambiante, humidité, etc.). Procédé d'extraction : indique le procédé employé pour obtenir l'extrait (I : extraction fractionnée du fromage ; II : extraction à l'eau sur le fromage délipidé ; III : extraction à l'eau sur le fromage lyophilisé). Concernant l'extrait éthanolique du fromage, seule la partie soluble dans l'eau a pu être analysée par cette méthode (cf. Partie 2, 4.2.1)

- 14 extraits aqueux issus de caillés lactiques de chèvre
  - 2 extraits à l'eau à 40 °C issus du procédé d'extraction I (dernière étape de la série d'extractions chimiques sur le fromage) (Protocole Partie 2, § 2.1.2 ; Figure 18)
  - 5 extraits à l'eau à 40 °C sur le fromage lyophilisé délipidé, issus du procédé d'extraction II (Protocole Partie 2, § 2.1.3 ; Figure 18)
  - 5 extraits à l'eau à 70 °C sur le fromage lyophilisé délipidé, issus du procédé d'extraction II (Protocole Partie 2, § 2.1.3 ; Figure 18)
  - Un extrait à l'eau à 40 °C et un extrait à l'eau à 70 °C sur le fromage lyophilisé non délipidé, issus du procédé d'extraction III (Protocole Partie 2, § 2.1.4)
- 2 extraits de fromage obtenus avec l'éthanol lors du procédé d'extraction I (Protocole Partie 2, § 2.1.2 ; Figure 18)
- 2 extraits issus du lait
  - Un extrait « lait délipidé » obtenu après délipidation du lait de chèvre au cyclohexane (Protocole Partie 2, § 2.2.2 ; Figure 19)
  - Le résidu solide final du lait de chèvre, obtenu après l'extraction à l'éthanol (dernière étape de la série d'extractions chimiques sur le lait, Protocole Partie 2, § 2.2.2 ; Figure 19)

## **2.1. Détermination de la composition chimique des extraits**

La détermination de la composition des extraits (tous les extraits sauf les extraits apolaires) a été réalisée par LC-MS (afin de séparer les différentes molécules et d'accéder à leur masse). Tous les extraits ont été analysés selon la même méthode, le même jour, de manière à ce que l'ensemble des analyses soit effectué dans les mêmes conditions (état de l'appareil, éluant utilisé, etc.). Des blancs (injection d'un solvant pour vérifier l'absence de contaminant dans l'appareil avant analyse) ont également été ajoutés en début et pendant la séquence d'analyse (5 au total), et ont été utilisés lors du traitement des données.

## **2.2. Analyse comparative des compositions chimiques des extraits**

### **2.2.1. Extraction et traitement des données**

Une fois les chromatogrammes obtenus (pour les extraits et les blancs), ceux-ci ont été traités à l'aide de la plateforme de calcul en ligne Workflow4Metabolomics (W4M) afin

d'obtenir les données relatives à la composition chimique des extraits [185]. L'obtention de ces données a été effectuée en deux étapes :

- L'extraction des pics, afin de déterminer leurs caractéristiques : l'intensité et la combinaison « m/z / RT » (masse de la molécule divisée par sa charge / temps de rétention, c'est-à-dire le temps que va mettre une molécule pour passer de l'injecteur au détecteur).
- Le prétraitement des données (Partie 2, § 4.3), qui a pour objectif de les préparer en vue de leur analyse.

Ces informations ont été classées sous forme d'une matrice de données, qui liste les 10022 pics observés (correspondant à la totalité des différents pics chromatographiques détectés dans l'ensemble des extraits analysés). Cela a permis d'établir le « profil brut » de chaque échantillon (18 profils d'extrait au total et 5 profils pour les blancs).

### **2.2.2. Analyse comparative des extraits**

A partir de ces profils, il est possible de comparer les différents extraits deux à deux afin de rechercher les différences et les points communs dans leur composition. Pour cela, dans un premier temps, une matrice « présence/absence de pics » a été créée. Puis, les données composant cette matrice ont été « nettoyées » en appliquant différents traitements (détaillés ci-après), de manière à ne conserver que les données relatives à chaque extrait pour leur comparaison :

- Tout d'abord, les données ont été « filtrées » en éliminant les « bruits parasites » liés à l'analyse LC-MS (appareil, solvants, etc.). Concrètement, les données concernant les pics présents dans l'analyse du premier blanc ont été supprimés. Ceci permet de ne conserver que les données caractéristiques des pics présents dans l'extrait étudié.
- Ensuite, les données concernant les pics correspondants aux 10 premières secondes de l'analyse chromatographique (temps correspondant au temps d'élimination du volume d'éluant présent entre le système d'injection et le détecteur au moment de l'injection de l'extrait étudié) ont été éliminées.
- Puis, enfin, les données correspondantes aux 15 dernières minutes de chaque analyse ont été supprimées. Ces données correspondent à celles obtenues lors de la phase de lavage de la colonne du système chromatographique.

Ces trois traitements ont permis d'éliminer toutes les données de la matrice de données qui

n'étaient pas spécifiques aux extraits analysés. Le nouveau jeu de données obtenu (8805 pics) permet d'établir un « profil filtré » pour chacun des extraits analysés par LC-MS (donc 18 profils d'extrait). Le profil d'un extrait peut être représenté graphiquement, chaque signal étant décrit par un point de coordonnées (abscisse : RT et ordonnée : m/z) (Figure 24). Cela permet d'obtenir un visuel exhaustif de la répartition des molécules en fonction du temps de rétention (donc de leur polarité) et de la masse. Néanmoins la méthode appliquée jusqu'ici a tout de même permis d'améliorer la qualité des données, comparativement aux données brutes, permettant ainsi de pouvoir effectuer une comparaison de la composition chimique entre extraits. Au cours du traitement de données les blancs 2 à 5 n'ont pas pu être totalement exploités, du fait de la présence de signaux supplémentaires par rapport au premier blanc, qui semble montrer qu'il persiste des traces provenant de l'extrait analysé précédent dans la séquence analytique. Il sera donc nécessaire de réaliser des traitements supplémentaires pour mieux comprendre l'origine de ces signaux et de rester très prudents quant à leur interprétation.

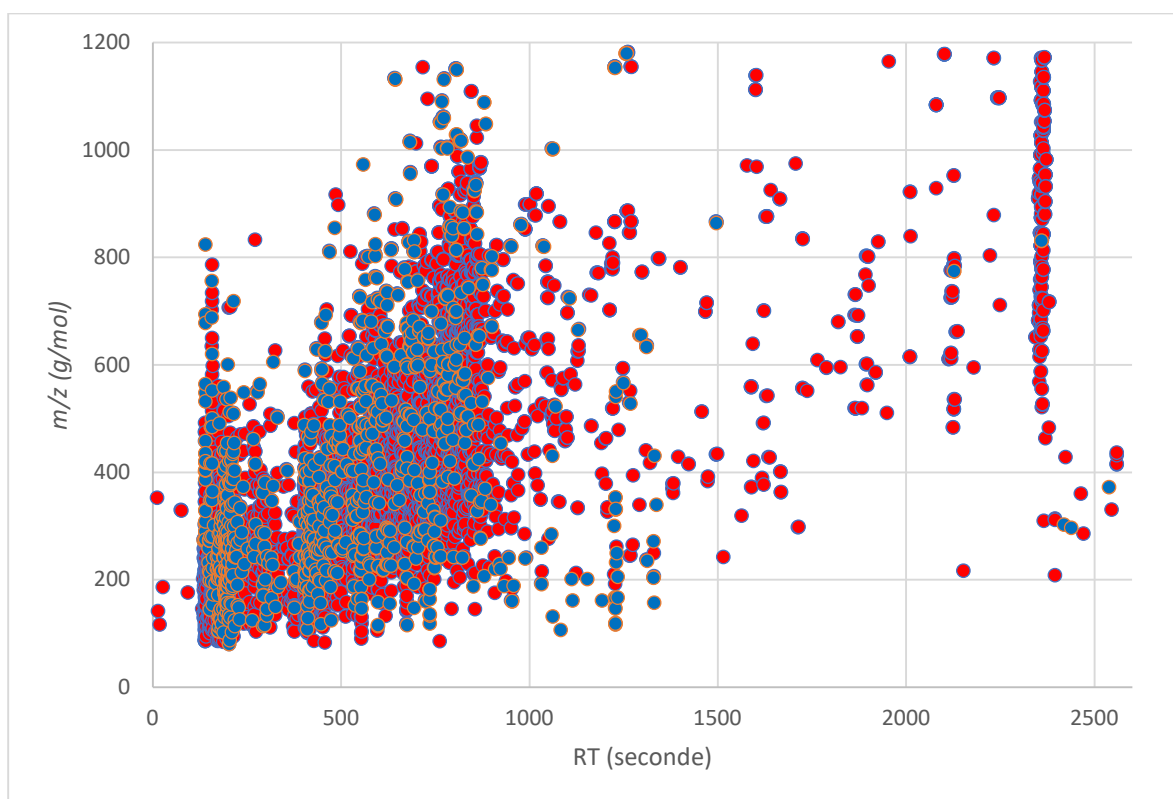


Figure 24 : Représentation du « profil filtré » de l'extrait W40 (obtenu par extraction à l'eau à 40 °C du fromage, selon le procédé II).

Cette représentation contient au total 7276 points, c'est-à-dire 7276 pics. ● : pic détecté en ionisation positive ; ● : pic détecté en ionisation négative. Étant donné que les pics négatifs sont moins nombreux, ils sont représentés par-dessus les pics positifs afin qu'ils ne soient pas masqués.

L'analyse comparative entre deux extraits se fait à partir de leurs profils filtrés respectifs. Cela permet notamment le calcul du « pourcentage d'homologie » entre ces deux extraits (correspondant au pourcentage de pics analytiques communs aux deux extraits). L'ensemble des pourcentages d'homologie entre les différents extraits analysés (comparaison des extraits deux à deux) est présenté dans le [Tableau 12](#).

Dans le [Tableau 12](#), les extraits ont été positionnés selon un ensemble de paramètres concernant leur extraction : dans l'ordre, la matrice modèle d'étude (lait ou fromage), le solvant d'extraction utilisé (éthanol ou eau) et la température d'extraction (40 °C et 70 °C). Cette présentation a ainsi permis de définir 4 « classes » distinctes d'extraits :

- Classe d'extraits n°1 : extraits issus de l'extraction du caillé lactique caprin, à l'eau à une température de 40 °C. Cela concerne 8 extraits différents.
- Classe d'extraits n°2 : extraits issus de l'extraction du caillé lactique caprin, à l'eau à une température de 70 °C. Cela concerne 6 extraits différents.
- Classe d'extraits n°3 : extraits issus de l'extraction du caillé lactique caprin, à l'éthanol à une température de 20 °C. Cela concerne 2 extraits différents.
- Classe d'extraits n°4 : extraits issus de l'extraction du lait de chèvre. Cela concerne 2 extraits différents.

L'analyse comparative des pourcentages d'homologie au sein de chacune des 4 classes d'extraits met en évidence que :

- La classe d'extraits n°1 est celle présentant le plus de disparités au sein de ses échantillons, en particulier avec l'extrait « W40 (3) ». Cependant, aucun paramètre ([Tableau 11](#)) n'a pour l'instant permis d'expliquer cela.
- Les classes d'extraits n°3 et n°4 se distinguent nettement des classes d'extraits n°1 et n°2, avec des « pourcentages d'homologie » inférieurs à 50 et une homogénéité des valeurs plus importante.



Tableau 12 : « Pourcentage d'homologie » entre extraits comparés 2 à 2.

	W40 (3)	WF	WF (2)	W40 (5)	W40 (6)	W40	W40 (2)	W40 (4)	W70 (5)	W70 (6)	W70	W70 (2)	W70 (3)	W70 (4)	C-FL	C-FL (2)	Résidu du lait	lait délipodé
W40 (3)	60	60	59	81	81	60	67	66	59	58	58	59	57	60	58	60	48	47
WF	60	93	93	75	74	87	88	89	83	81	83	81	80	80	38	37	31	34
WF (2)	59	93	73	73	76	88	90	88	86	83	84	83	81	82	38	37	30	33
W40 (5)	81	75	73	92	92	72	80	80	69	67	67	68	66	68	49	50	38	38
W40 (6)	81	74	76	72	74	74	83	81	70	68	68	69	66	69	48	49	38	38
W40	60	87	88	72	74	85	85	85	83	80	82	81	66	43	43	69	38	38
W40 (2)	67	88	90	80	83	85	92	92	81	78	79	79	82	40	39	40	30	33
W40 (4)	66	89	88	80	81	85	92	89	80	77	78	78	76	40	39	31	31	33
W70 (5)	59	83	86	69	70	83	81	80	91	89	89	90	88	43	42	34	34	37
W70 (6)	58	81	83	67	68	80	78	77	91	89	89	91	88	46	44	37	40	40
W70	58	83	84	67	68	82	79	78	89	89	89	89	86	46	44	37	40	40
W70 (2)	59	81	83	68	69	81	79	78	90	91	89	87	87	46	44	37	40	40
W70 (3)	57	81	81	66	66	79	77	76	88	88	86	87	85	45	43	38	38	41
W70 (4)	60	80	82	68	69	82	78	77	89	88	88	87	85	47	45	38	38	41
C-FL	58	38	38	49	48	43	40	40	43	46	46	46	45	47	89	69	68	68
C-FL (2)	60	37	37	50	49	42	39	39	42	44	44	44	43	45	89	68	66	66
Résidu du lait	48	31	30	38	38	34	30	31	34	37	37	37	38	38	69	68	91	91
lait délipodé	47	34	33	38	38	37	33	33	37	40	40	40	41	41	68	66	91	91

Dans ce tableau les extraits ont été rassemblés en fonction du modèle d'étude (lait ou fromage), du solvant et de la température d'extraction.

Afin de poursuivre l'analyse comparative de ces différentes classes d'extraits, en plus des « pourcentages d'homologie », des calculs de distances entre les extraits ont été réalisés. Le calcul de ces distances permettra de représenter ces classes d'un point de vue mathématique, et ainsi de pouvoir réaliser davantage de traitements de données (calcul de moyennes, d'écart-types, etc.) impossibles à effectuer avec les « pourcentages d'homologie ». Afin de déterminer ces distances, chaque extrait est représenté par un vecteur. Chaque vecteur comporte 8805 coordonnées (correspondant à chaque pic de la matrice de données des « profils filtrés »). La valeur de chacune de ces coordonnées sera égale à 1 ou à 0 (selon la présence ou absence du pic dans l'extrait, respectivement). La distance  $D$  entre deux extraits  $x$  et  $y$  correspond à la distance euclidienne entre les deux vecteurs correspondants (*Équation 3*).

$$\text{Équation 3 : } D(x, y) = \sqrt{\sum (x_i - y_i)^2}$$

Avec  $x_i$  et  $y_i$  : coordonnées des deux vecteurs  $x$  et  $y$ , respectivement.

L'obtention des distances entre les extraits (deux à deux) permet de représenter graphiquement chaque classe d'extraits sous la forme d'un nuage de points. Chaque point représente un extrait de la classe étudiée. Il est alors possible de déterminer, pour chacune des 4 classes d'extraits, **i**) le centre de gravité (correspondant à l'extrait fictif le plus représentatif du nuage de points) et **ii**) l'écart-type (correspondant à la disparité des distances au sein d'une même classe d'extraits) (les valeurs d'écart-type pour chaque classe sont indiquées dans la diagonale du Tableau 13). Une valeur élevée de l'écart-type met en évidence une différence importante entre les extraits d'une même classe d'extraits. Les données présentées dans le [Tableau 13](#) permettent de confirmer les observations précédentes, à savoir que la classe d'extraits n°1 est la moins homogène des 4, avec la valeur d'écart-type la plus élevée (28,22).

Tableau 13 : Ecart-type des distances intra-classe, et distances inter-classes.

	Classe d'extraits n°1	Classe d'extraits n°2	Classe d'extraits n°3	Classe d'extraits n°4
Classe d'extraits n°1	28,22	31,69	62,10	67,86
Classe d'extraits n°2	31,69	20,57	64,74	69,12
Classe d'extraits n°3	62,1	64,74	15,17	49,12
Classe d'extraits n°4	67,86	69,12	49,12	14,12

Les valeurs en diagonales correspondent à l'écart-type des distances au sein d'une classe (distances intra-classe). Les autres valeurs correspondent à la distance séparant le centre de gravité de deux classes (distances inter-classes)

La représentation des classes d'extraits sous la forme de nuages de points (chaque point correspondant à un extrait appartenant à la classe) correspond à des espaces dont les dimensions sont importantes. L'espace de chacune des classes a une dimension correspondant au nombre total de pics chromatographiques observés dans l'ensemble des analyses chromatographiques (« profils filtrés », 8805 pics) des extraits composant la classe. De ce fait, il est donc impossible de se représenter mentalement ces espaces. Cependant, il est toutefois possible de visualiser chaque « classe » (correspondant à chaque espace) sous la forme d'un cercle, dont le centre correspond au centre de gravité de cette « classe », et le rayon correspondrait à l'écart-type (Figure 25). A partir de cette représentation, il est possible de visualiser les distances séparant les différentes classes d'extraits : cela correspond à la distance entre les centres de gravité des différentes classes, c'est-à-dire à la distance entre les centres des différents cercles (Figure 25). Les valeurs des distances entre classes sont présentées dans le Tableau 13 (valeurs autres que celles présentes sur la diagonale du Tableau 13).

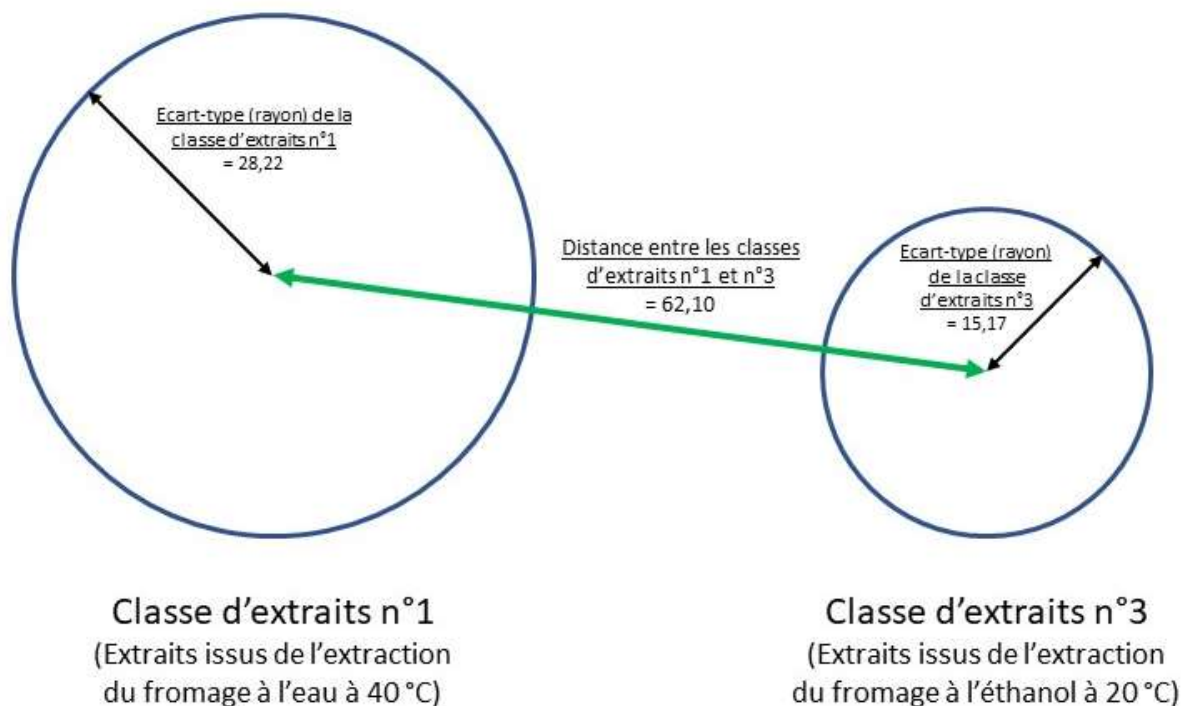


Figure 25 : Représentation des deux classes d'extraits n°1 et n°3 sous forme de cercle

L'objectif de recourir au calcul de ces distances entre les classes d'extraits est de déterminer si elles sont, ou non, clairement distinctes les unes des autres. Si deux classes d'extraits sont considérées comme distinctes l'une de l'autre, il est possible de conclure que les compositions chimiques de leurs extraits respectifs sont très différentes. Si les représentations circulaires de deux classes d'extraits se chevauchent, cela signifie qu'il existe des similitudes de composition chimique entre les extraits respectifs qui les composent. Afin de déterminer ces éventuels chevauchements, il est nécessaire de comparer la distance séparant deux classes avec la somme de leurs écart-types. L'exemple présenté en [Figure 25](#) met en évidence que la valeur correspondant à la distance entre les classes n°1 et n°3 (62,10) est supérieure à la somme des écart-types ( $28,22 + 15,17 = 43,38$ ). Par conséquent ces deux « classes » sont différentes (ainsi que les extraits qui les composent). Le même résultat est obtenu pour la comparaison des classes d'extraits n°3 et n°4. Concernant les classes d'extraits n°1 et n°2, la valeur de la distance les séparant (31,69, valeur en orange dans le [Tableau 13](#)) est inférieure à la somme de leurs écart-types ( $28,22 + 20,57 = 48,78$ ). Ces deux classes d'extraits se chevauchent partiellement ([Figure 26](#)). Ceci est cohérent dans la mesure où les extraits qui les composent sont tous issus d'extractions aqueuses du caillé lactique. Cependant, étant donné que ces deux classes ne se superposent pas, cela confirme que la variation de la température d'extraction (40 °C ou 70 °C) a bien eu un impact sur la composition chimique des extraits obtenus.

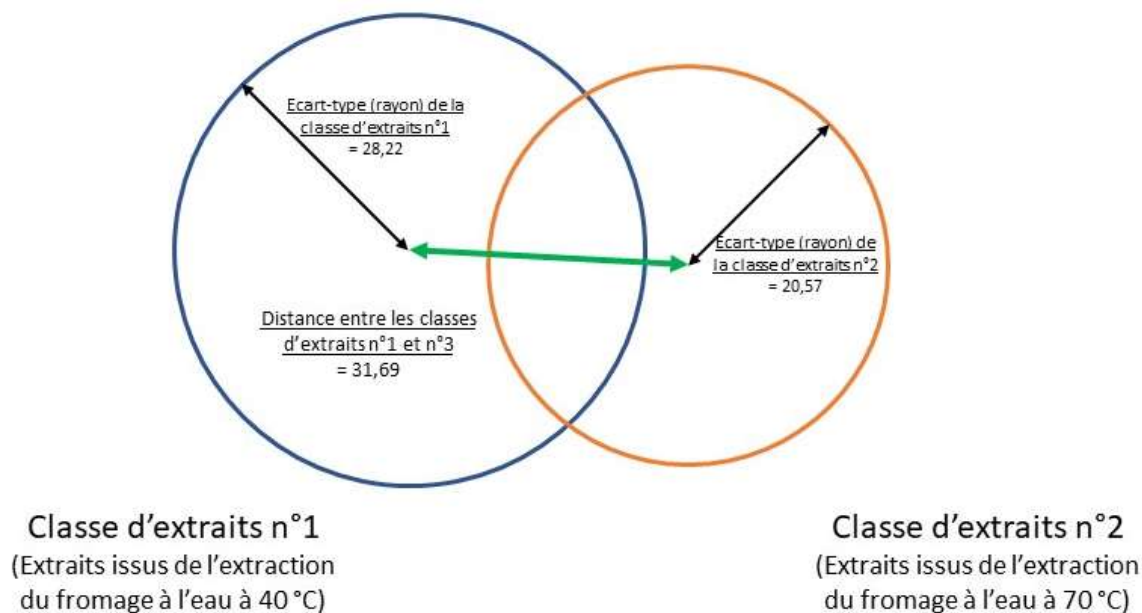


Figure 26 : Représentation des deux classes d'extraits n°1 et n°2 sous forme de cercles qui se chevauchent partiellement.

Les résultats obtenus avec cet outil sont prometteurs, malgré le nombre restreint d'échantillons à disposition. Ces résultats ont permis de valider la méthodologie analytique développée au cours de ces travaux. Celle-ci pourra donc être mise en œuvre lors de futurs travaux, sur un nombre plus important d'échantillons, et pour déterminer les molécules porteuses de l'activité biologique au sein des extraits de fromage.

### **2.3. Mise en relation de la composition chimique des extraits avec leurs activités biologiques**

L'objectif de développer ces différents outils de traitement de données est d'orienter la détermination des molécules bioactives en comparant les profils moléculaires des extraits bioactifs et ceux des extraits ne présentant pas de bioactivité (en éliminant notamment toutes les molécules communes aux extraits non bioactifs). Pour cela, les jeux de données sont traités en conservant les données correspondant aux pics chromatographiques communs à tous les extraits porteurs de la même activité biologique (ex : extraits entraînant la survie du nématode *C. elegans* en condition de stress oxydant), et absents des profils chromatographiques des extraits non porteurs de cette activité. Cela permet donc de ne conserver que les signaux correspondant à des molécules potentiellement porteuses de l'activité biologique étudiée.

Afin d'illustrer cette méthode, celle-ci a été appliquée en s'intéressant uniquement aux

extraits aqueux de fromages de chèvre ayant présenté un effet bénéfique sur la survie du ver en milieu oxydant. Cela a permis de réduire le nombre de signaux, passant de 8805 à 4420, soit 50 % des signaux des « profils filtrés » (Figure 27). La représentation graphique en Figure 27 montre que les signaux correspondant à des molécules potentiellement porteuses de l'activité se situent essentiellement dans la première partie du chromatogramme (RT < 1000 secondes). Concernant la masse des signaux, celle-ci semble se répartir en majorité en dessous de 600 g/mol, mais le nombre de pics candidats est encore trop important pour pouvoir distinguer nettement des molécules ou des « groupes » de molécules. En augmentant le jeu de données, c'est-à-dire en disposant d'un nombre plus important d'extraits bioactifs et non bioactifs, il serait possible de réduire davantage le nombre de signaux correspondant aux molécules responsables de cette activité biologique. Cela permettrait donc de gagner du temps pour déterminer ces molécules bioactives (ou au moins de déterminer des zones de localisations distinctes sur les profils chromatographiques) et pour diriger le fractionnement afin de les isoler. Cet outil apparaît donc comme prometteur pour la recherche de métabolites actifs dans les extraits.

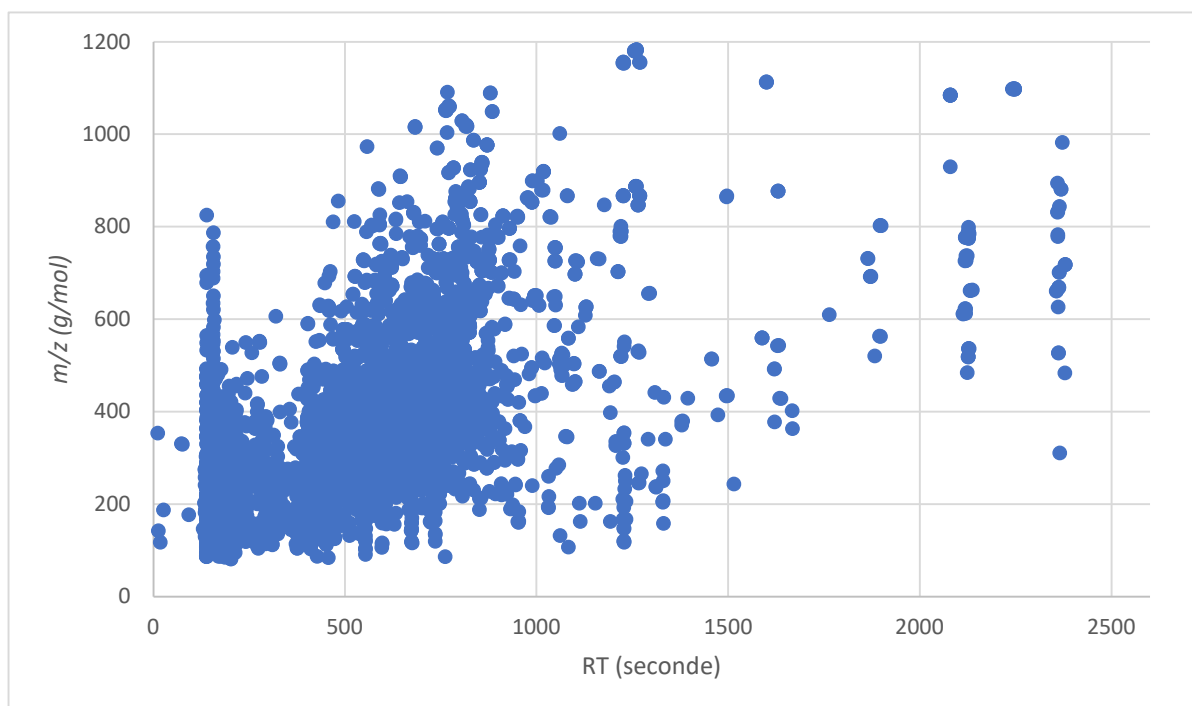


Figure 27 : Ensemble des signaux correspondant à des molécules pouvant être responsables de l'activité bénéfique et présents dans les extraits aqueux entraînant une survie du nématode en condition de stress oxydant (W40, W40 (4), W40 (6), WF, W70, W70 (4) et W70 (6)).

*Au total, 4420 signaux ont été identifiés sur les 8805 issus des profils filtrés*



*Quatrième partie :*

*Discussion et*

*perspectives*





Les ressources naturelles constituent un réservoir de molécules d'une grande diversité, dont certaines possèdent un effet bénéfique sur la santé humaine. La bioressource végétale a ainsi été très étudiée pour un usage santé, dans le but de développer de nouveaux traitements [1,3]. D'autres ressources naturelles restent cependant peu explorées, comme la bioressource microbienne. Ces microorganismes présentent un fort intérêt en tant que nouvelle source de métabolites bioactifs originaux. Pour cette raison, la recherche et l'obtention de métabolites bioactifs, produits par des microorganismes non pathogènes utilisés et/ou retrouvés dans les matrices alimentaires, apparaissent comme prometteuses. La plupart des matrices alimentaires n'ont jamais été étudiées en tant que sources de molécules bioactives. Cependant, il est possible de considérer certaines d'entre elles, en particulier les matrices fermentées, comme des bioréacteurs permettant la production, par les communautés microbiennes qu'elles renferment, d'une grande diversité de métabolites. Parmi ces aliments fermentés, le fromage au lait cru (donc à microbiote complexe) apparaît comme une source intéressante de métabolites dont le potentiel d'innovation lié à leurs activités biologiques est important.

La recherche des molécules potentiellement bioactives issues de fromages et l'étude de leurs activités nécessitent le développement d'une stratégie. Au cours de cette thèse, les travaux ont été focalisés sur la recherche de molécules ayant un effet sur le vieillissement, et principalement sur le processus de longévité. Pour cela, une stratégie se décomposant en quatre étapes a été développée :

- Etape 1 : sélection du fromage modèle d'étude.
- Etape 2 : extraction du fromage afin d'obtenir différents extraits, de composition moléculaires différentes. L'extraction a été réalisée de façon à permettre l'obtention de la majorité des molécules présentes dans cette matrice fromagère.
- Etape 3 : étude de l'impact des différents extraits sur le processus de vieillissement et détermination des mécanismes d'action des extraits bioactifs. Lors de cette étape, des tests biologiques mettant en jeu des modèles *in vitro* et *in vivo* ont été utilisés.
- Etape 4 : étude de la composition des extraits définis comme bioactifs lors de l'étape 3.

La sélection du fromage pour l'étude a conduit à retenir un caillé lactique caprin à 20 jours d'affinage. Comme décrit dans la partie « État de l'art » de ce manuscrit (Partie 1, Chapitre 4, § 1.1.), ce fromage a été retenu car il s'agit d'un modèle de fromage considéré comme « simple », plus approprié pour développer et valider une stratégie de recherche de métabolites, en comparaison avec d'autres variétés de fromage « plus complexes ». Ce fromage a été

sélectionné à une période de 20 jours d'affinage, qui correspond à la période à laquelle il sera le plus souvent commercialisé et consommé.

Une fois le fromage sélectionné, la deuxième étape de cette stratégie consiste en la séparation des molécules de la matrice fromagère. Afin de réaliser cela, une méthode d'extraction différentielle a été développée au cours de cette thèse. L'utilisation de 5 solvants de polarités croissantes (cyclohexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle, éthanol absolu et eau) a permis l'obtention de 8 extraits de natures différentes : un extrait apolaire (issu de l'extraction au cyclohexane), un extrait obtenu avec le dichlorométhane, un extrait obtenu avec l'acétate d'éthyle, un extrait obtenu avec de l'éthanol, 3 extraits aqueux (obtenus avec des températures d'extraction différentes) et le résidu final du fromage. La réalisation d'une étude dite par « épuisement » a permis de valider l'efficacité de la méthode d'extraction développée sur le caillé lactique caprin. A ces 8 extraits a été ajouté le fromage lyophilisé, qui a été considéré comme un extrait en soit dans le cadre de ces travaux, conduisant ainsi à un total de 9 extraits.

L'évaluation de l'activité biologique des extraits ainsi obtenus a consisté à déterminer leur effet sur le vieillissement (étape 3 de la stratégie). Un modèle *in vivo*, mettant en jeu le nématode *C. elegans*, a été choisi comme crible biologique, car il permet l'évaluation de l'impact des extraits sur le paramètre « longévité ». Cette évaluation biologique a permis d'identifier et de retenir 6 extraits qui présentent un impact positif sur la longévité du nématode : fromage lyophilisé, extrait apolaire, les 3 extraits aqueux et le résidu final du fromage. La poursuite des travaux de recherche a permis de mettre en évidence que l'action bénéfique de 5 de ces 6 extraits (fromage lyophilisé, extrait apolaire et les 3 extraits aqueux) implique le facteur de transcription DAF-16, protéine régulant les phénomènes de vieillissement chez le ver [157,162,163]. Des études complémentaires ont montré que ces 5 extraits, issus du caillé lactique caprin, permettent une protection du nématode en condition de stress oxydant (maintien du paramètre « longévité » contrairement à la condition témoin (non-ajout d'extrait dans le milieu de culture du nématode)). Il a aussi été montré que, parmi ces 5 extraits testés, seule l'action de l'extrait apolaire implique à la fois le facteur de transcription DAF-16 et le récepteur TOL-1 de la voie p38 MAPK. L'ensemble de ces résultats met en évidence, sur le modèle *in vivo* utilisant le nématode, que : **i**) 5 extraits issus du caillé lactique caprin ont un effet positif sur le processus de vieillissement (augmentation de la longévité) ; **ii**) ces 5 mêmes extraits ont également un effet protecteur contre le stress oxydant (processus intervenant notamment lors des affections liées au vieillissement [22]) en augmentant la résistance du nématode cultivé en condition oxydante ; **iii**) la bioactivité de ces extraits implique deux mécanismes biologiques : la voie

DAF-2/ILR et la voie p38 MAPK (deux voies biologiques conservées entre le ver et l'Homme).

Aussi, une étude complémentaire utilisant un modèle biologique *in vitro*, mettant en jeu des leucocytes humains stimulés au PMA (phorbol myristate acetate), a permis de montrer que 2 des extraits issus de la matrice fromagère modèle (extrait apolaire et un des trois extraits aqueux) induisent une diminution de la production de radicaux libres. Ces résultats *in vitro* sont prometteurs et permettent d'envisager une application sur la santé humaine.

La quatrième étape de la stratégie de recherche développée a consisté à étudier comparativement la composition chimique des extraits ayant été définis précédemment comme biologiquement actifs (étape 3). Cette étude a été réalisée en analysant les extraits apolaires et aqueux (obtenus dans les mêmes conditions) issus de différents lots de production de la matrice fromagère modèle, mais aussi du lait caprin ayant servi à la production de ces lots de fromage. L'objectif de cette étape a été d'obtenir un visuel exhaustif de la composition de chaque extrait et ensuite de réaliser une analyse comparative des profils ainsi obtenus. Cela permettra, à terme, d'envisager d'établir le lien entre la composition d'un extrait et son activité biologique (en mettant en évidence les molécules susceptibles d'être porteuses de l'activité). Au cours de la thèse, une méthode d'analyse a été développée afin de comparer deux à deux les profils chimiques de composition des extraits non apolaires. La mise en œuvre de cette méthode a permis, en comparant le profil des extraits définis comme bioactifs et des extraits considérés comme non bioactifs, de réduire le nombre de molécules potentiellement responsables de la bioactivité (passant de 8805 signaux à 4420, soit une réduction de 50 %). Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer plus précisément les molécules actives, et notamment augmenter le nombre d'extraits à analyser ainsi que pour avoir, parmi ces extraits, des réponses biologiques différentes (des extraits actifs et des extraits non actifs) pour affiner la recherche.

L'ensemble des résultats rappelés précédemment a été obtenu dans le cadre du développement d'une stratégie innovante visant à rechercher des métabolites bioactifs dans un aliment fermenté particulier : le fromage au lait cru. L'obtention d'extraits de fromage à l'aide de solvants a déjà été réalisée dans certaines études, de manière à isoler des molécules spécifiques de l'aliment (peptides, polyphénols, acides gras, etc.) en vue de les étudier notamment pour leurs propriétés organoleptiques, nutritionnelles et texturantes ou pour leurs activités [148,186–193]. La méthode d'extraction développée et appliquée au cours de la thèse se distingue de ces travaux en balayant l'ensemble de la gamme de polarités moléculaires. Cela permet d'extraire efficacement la très grande majorité des molécules du caillé lactique caprin.

Cependant, cette méthode a été développée en utilisant qu'une seule des nombreuses matrices fromagères existantes. Cette même méthodologie d'extraction développée a été mise en œuvre pour extraire du lait de chèvre. Cela a permis de confirmer que cette méthodologie d'extraction était utilisable, avec la même efficacité (par épuisement avec calcul des rendements à chaque étape), pour l'extraction du second type de matrice alimentaire rencontrée dans la filière laitière (matrice liquide : le lait). Ces résultats laissent envisager la possibilité d'utiliser cette méthode d'extraction pour isoler et étudier les molécules de différents laits (issus de différents animaux) et/ou de différents fromages (issus de laits de différents animaux et/ou issus de différents procédés de fabrication). Cela permettrait d'étendre l'étude actuelle en réalisant une étude comparative entre ces fromages et notre caillé lactique caprin. Cela pourrait permettre d'identifier d'autres nouvelles molécules bioactives, et/ou d'identifier d'autres sources, au sein de la filière alimentaire laitière, contenant les mêmes molécules bioactives que celles issues du caillé lactique caprin mais disponibles en plus grande quantité ou à moindre coût (ex : issues de lait/fromage de vache plutôt que de lait/fromage de chèvre) [194,195]. Ce dernier point est particulièrement important pour envisager une éventuelle valorisation de ces molécules naturelles bioactives dans les domaines de la santé (animale et humaine), de la pharmabiotique et de la nutraceutique.

Les différents résultats obtenus sur le nématode au cours des travaux de thèse confirment la présence d'au moins 3 familles moléculaires bioactives dans le caillé lactique caprin : une famille apolaire (issue de l'extrait apolaire) et deux familles polaires différentes, issues des extraits aqueux à 40 °C et à 70 °C. En effet, ces deux extraits aqueux présentent une différence dans leur activité biologique (par exemple lors de l'étude de la longévité du mutant GR1307 n'exprimant pas DAF-16). Cela confirme donc l'intérêt de faire varier la température lors de l'extraction aqueuse de la matrice fromagère modèle, cette variation permettant d'extraire des molécules bioactives de natures différentes. L'ensemble des résultats obtenus sur le ver suggèrent également que, pour ce caillé lactique caprin, seuls l'extrait apolaire et les extraits aqueux présentent un effet bénéfique lors des tests biologiques. Cet élément est important afin d'envisager une future valorisation de ces extraits sous forme d'ingrédients bioactifs à destination des secteurs de la santé, de la nutraceutique ou de la pharmabiotique. En effet, il ne sera d'une part, pas nécessaire de réaliser toute la série d'extractions avec les 5 solvants de polarité croissante pour obtenir un extrait actif. D'autre part, cela permettra d'envisager un transfert industriel facilité du procédé d'extraction, en évitant l'emploi de solvants difficilement utilisables en industrie pour des raisons réglementaires et/ou de sécurité. Il apparaît donc

suffisant de réaliser uniquement le procédé d'extraction II, c'est-à-dire une délipidation du fromage lyophilisé au cyclohexane suivi d'une extraction à l'eau à 40 °C ou à 70 °C (Figure 18).

Les résultats de ces travaux de thèse permettent aussi de confirmer que la méthode développée pour cribler l'activité biologique d'extraits de fromage a permis de montrer la pertinence d'utiliser le modèle *C. elegans*. Cela a permis une évaluation rapide de l'impact des extraits directement sur un modèle *in vivo*, et de réaliser un premier tri parmi les extraits de fromage. Ce modèle a également permis d'approfondir les mécanismes biologiques impliqués dans l'action des extraits présentant une activité intéressante. Contrairement à des tests *in vitro* sur modèle cellulaire, ce modèle permet de réaliser une étude d'impact des extraits sur un organisme multicellulaire plus complexe. Cependant, ce modèle ne permet pas de se soustraire aux études sur mammifères, qui peuvent être nécessaires pour évaluer l'impact des extraits sur leurs organismes en vue d'une future valorisation dans le domaine de la santé (animale et humaine).

La réalisation de la quatrième étape de la stratégie développée au cours de cette thèse a conduit au développement d'une méthode d'analyse comparative qui permet de comparer deux à deux les profils d'extraits. Les résultats obtenus (permettant de focaliser la recherche des molécules responsables de l'effet bénéfique des extraits sur la survie du ver en milieu oxydant sur un peu moins de la moitié de l'ensemble des molécules extraites du fromage) sont prometteurs pour la suite des travaux, et laissent envisager deux optiques permettant la valorisation de ce travail : **i)** dans une démarche de recherche, pour identifier plus rapidement et plus facilement des familles de molécules bioactives dans des extraits (par analyse comparative des compositions d'extraits bioactifs et d'extraits non bioactifs) ; **ii)** dans une démarche de valorisation industrielle en proposant une méthodologie s'inscrivant dans une démarche qualité (pour référencer des nouvelles matières premières et/ou pour contrôler des produits finis). En effet, cette méthodologie d'analyse comparative peut permettre :

- De proposer une approche nouvelle afin de resserrer la recherche d'une molécule bioactive dans les extraits. Cette approche repose sur la comparaison entre les profils d'extraits (actifs et/ou non actifs). Cela permettra ainsi de réduire le nombre de molécules candidates potentielles à isoler et à caractériser.
- De constituer une base de données contenant les profils de composition des extraits d'intérêt, biologiquement actifs et qui puisse être utilisée lors d'une approche pré-

dictive. Ainsi, en analysant un nouveau fromage (extrait dans les mêmes conditions), il sera possible de supposer que celui-ci sera biologiquement actif ou non, en comparant son profil de composition chimique avec ceux des extraits actifs contenus dans la base de données.

- D'utiliser également cette base de données comme une base de référence lors d'une démarche de qualité, dans le cadre d'une valorisation industrielle. Cette démarche permettra la sélection des nouvelles matières premières (nouveaux producteurs de fromages) et/ou de contrôler la qualité des produits finis (extraits de fromage) pour une utilisation en tant qu'ingrédients actifs.

Le travail réalisé autour du développement de cet outil est prometteur, mais requiert d'être poursuivi afin d'augmenter le nombre de données à disposition. Pour cela, il est nécessaire de réaliser de nouveaux extraits, que ce soit à partir d'un même type de caillé lactique caprin ou en étudiant d'autres types de fromage (pâtes persillées, pâtes cuites, etc.).

L'ensemble des travaux réalisés au cours de cette thèse a ainsi permis de développer une nouvelle stratégie innovante afin de déterminer les fonctionnalités d'un caillé lactique caprin et de sa flore microbienne. Les résultats obtenus ont permis de montrer : **i)** la faisabilité de la stratégie développée ; **ii)** la possibilité d'obtenir des extraits de fromages qui soient bioactifs ; **iii)** la possibilité d'accélérer la recherche des molécules porteuses de l'activité biologique en réduisant de 50 % le nombre de molécules à étudier. Ces résultats encouragent à poursuivre l'investigation sur deux aspects :

- Valoriser les résultats obtenus sur le ver, en poursuivant l'étude sur d'autres tests afin d'évaluer l'implication éventuelle d'autres mécanismes biologiques, par exemple à l'aide de tests d'activités antioxydantes et anti-inflammatoires (notamment radicaux libres, PGE<sub>2</sub>, IL1-β). Il serait également intéressant de poursuivre en étudiant l'effet des extraits chez le mammifère et/ou l'Homme, par des tests *in vitro* spécifiques (par exemple, activité chondroprotectrice pour l'arthrose), voire *in vivo* (par exemple sur des rats arthrosiques).
- Étudier la composition chimique des extraits, à l'aide de l'outil de traitement de données développé au cours de la thèse, afin de déterminer la ou les molécule(s) à isoler. Cela permettra de réaliser le fractionnement des extraits concernés, afin d'obtenir ces métabolites et d'évaluer leurs activités.

Enfin, il serait intéressant d'étudier la composition microbienne du caillé lactique caprin, afin d'identifier le(s) microorganisme(s) à l'origine de la production du ou des métabolite(s) bioactif(s). Cela permettra, à terme, de proposer des ingrédients innovants d'origine naturelle :

- Soit en réalisant un extrait d'une matrice fromagère optimisée (enrichie avec la souche du microorganisme d'intérêt, permettant la production du (des) métabolite(s) bioactif(s) d'intérêt).
- Soit en cultivant le(s) microorganisme(s) d'intérêt(s) et en lui (leurs) faisant produire les métabolites voulus dans un réacteur à fermentation (induction métabolique).
- Dans l'objectif d'une application comme pré ou probiotique : en produisant la (les) souche(s) isolée(s) de microorganisme(s) qui sera (seront) consommée(s) par le patient. L'objectif est que le(s) microorganisme(s) produise(nt) des métabolites une fois dans le corps.
- Soit en produisant le(s) microorganisme(s), pour ensuite proposer des lysats contenant les molécules actives ou bien qui, une fois consommées, induiraient la production de molécules actives dans le corps (par exemple, par le microbiote intestinal qui serait alors stimulé).

L'objectif final est de réaliser des études supplémentaires, comme celles détaillées ci-dessus, afin d'évaluer l'activité biologique de ces ingrédients. Il sera alors envisageable de valoriser les résultats obtenus *via* le développement d'un nouveau programme visant à utiliser le ou les ingrédients actifs dans la composition de produits microbiotiques en santé animale et humaine. Ainsi, cela conduira au développement d'une nouvelle forme galénique pouvant être valorisée au niveau industriel, pour être, à terme, mise sur le marché.





*Références*

*bibliographiques*



## Références bibliographiques

1. De Pasquale A. Pharmacognosy: the oldest modern science. *J Ethnopharmacol.* 1984;11:1–16.
2. Coulerie P. Etude phytochimique et pharmacologique de plantes de Nouvelle-Calédonie à potentialités anti-dengue. Université de la Nouvelle-Calédonie; 2012.
3. Paulsen BS. Highlights though the history of plant medicine. In: *Bioactive compounds in plants - benefits and risks for man and animals.* 2010. p. 18–29.
4. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J Nat Prod.* 2020;83:770–803.
5. Fabricant DS, Farnsworth NR. The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery. *Environ Health Perspect.* 2001;109(SUPPL. 1):69–75.
6. Pace NR. A Molecular View of Microbial Diversity and the Biosphere. *Science (80- ).* 1997;276:734–40.
7. Kekkonen RA, Lummela N, Karjalainen H, Latvala S, Tynkkynen S, Järvenpää S, et al. Probiotic intervention has strain-specific anti-inflammatory effects in healthy adults. *World J Gastroenterol.* 2008;14(13):2029–36.
8. Rocha CS, Lakhdari O, Blotière HM, Blugeon S, Sokol H, Bermúdez-Humarán LG, et al. Anti-inflammatory Properties of Dairy Lactobacilli. *Inflamm Bowel Dis.* 2012;18(4):657–66.
9. Herreros MA, Sandoval H, González L, Castro JM, Fresno JM, Tornadijo ME. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *Food Microbiol.* 2005;22:455–9.
10. Boruta T, Bizukoje M. Induction of secondary metabolism of *Aspergillus terreus* ATCC 20542 in the batch bioreactor cultures. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016;100:3009–22.
11. Kumar RR, Prasad S. Metabolic Engineering of Bacteria. *Indian J Microbiol.* 2011;51(3):403–9.
12. Lee SY, Kim HU, Park JH, Park JM, Kim TY. Metabolic engineering of microorganisms: general strategies and drug production. *Drug Discov Today.* 2009;14(1/2):78–88.
13. Sanchez S, Demain AL. Metabolic regulation of fermentation processes. *Enzyme Microb Technol.* 2002;31:895–906.

14. Wang Y, Chen S, Yu O. Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011;91:949–56.
15. Hassane CS, Fouillaud M, Le Goff G, Sklirou AD, Boyer JB, Trougakos IP, et al. Microorganisms Associated with the Marine Sponge *Scopalina hapalia*: A Reservoir of Bioactive Molecules to Slow Down the Aging Process. *Microorganisms*. 2020;8:1–23.
16. Fonds des Nations Unis pour la Population, HelpAge International. Vieillir au vingt et unième siècle : Une victoire et un défi. 2012.
17. Athari E, Papon S, Robert-Bobée I. Quarante ans d'évolutions de la société française : le vieillissement de la population s'accélère avec l'avancée en âge des *baby-boomers*. In: *Eclairage - Quarante ans d'évolutions de la société française*. 2019. p. 11–26.
18. OMS. Rapport mondial sur le vieillissement et la santé. 2016.
19. Senay V. Les pertes liées au vieillissement et le recours à la déprise. 2015.
20. Vieillesse : définition [Internet]. Available from: <https://cnrtl.fr/definition/vieillesse>
21. Pal Yu B, Young Chung H. The inflammatory process in aging. *Rev Clin Gerontol*. 2006;16:179–87.
22. Sarkar D, Fisher PB. Molecular mechanisms of aging-associated inflammation. *Cancer Lett*. 2006;236:13–23.
23. Pike LJ, Viciani E, Kumar N. Microbial diversity knows no borders. *Nat Rev Microbiol [Internet]*. 2018;16:66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2017.166>
24. Campbell-Platt G. Fermented foods - a world perspective. *Food Res Int*. 1994;27:253–7.
25. Mota de Carvalho N, Costa EM, Silva S, Pimentel L, Fernandes TH, Estevez Pintado M. Fermented Foods and Beverages in Human Diet and Their Influence on Gut Microbiota and Health. *Fermentation*. 2018;4:1–13.
26. Şanlıer N, Gökçen BB, Sezgin AC. Health benefits of fermented foods. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2017;59:506–27.
27. De-Magistris T, Lopéz-Galán B. Consumers' willingness to pay for nutritional claims fighting the obesity epidemic: the case of reduced-fat and low salt cheese in Spain. *Public Health*. 2016;135:83–90.
28. Johnson ME, Kapoor R, McMahan DJ, McCoy DR, Narasimmon RG. Reduction of

- Sodium and Fat Levels in Natural and Processed Cheeses: Scientific and Technological Aspects. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2009;8:252–68.
29. Choi KH, Lee H, Lee S, Kim S, Yoon Y. Cheese Microbial Risk Assessments - A Review. *Asian-Australasian J Anim Sci*. 2016;29(3):307–14.
30. Peña JA, Rogers AB, Ge Z, Ng V, Li SY, Fox JG, et al. Probiotic *Lactobacillus* spp. Diminish *Helicobacter hepaticus*-Induced Inflammatory Bowel Disease in Interleukin-10-Deficient Mice. *Infect Immun*. 2005;73(2):912–20.
31. Uroić K, Nikolić M, Kos B, Pavunc AL, Beganović J, Lukić J, et al. Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Croatian Fresh Soft Cheese and Serbian White Pickled Cheese. *Food Technol Biotechnol*. 2014;52(2):232–41.
32. Amdekar S, Roy P, Singh V, Kumar A, Singh R, Sharma P. Anti-Inflammatory Activity of *Lactobacillus* on Carrageenan-Induced Paw Edema in Male Wistar Rats. *Int J Inflam*. 2012;2012:1–6.
33. Institut de l'agriculture et de l'alimentation biologique. Substances naturelles en production végétale. In 2019. p. 1–29. Available from: <http://itab.asso.fr/downloads/com-intrants/2019-jtintrants-actes.pdf>
34. Lafont O. Du saule à l'aspirine. *Rev d'histoire la Pharm 94e année*. 2007;354:209–16.
35. Chabrier J-Y. Plantes Médicinales Et Formes D'Utilisation En Phytothérapie. 2010.
36. Guénard D, Guéritte-Voegelein F, Potier P. Taxol and Taxotere: Discovery, Chemistry, and Structure-Activity Relationships. *Acc Chem Res*. 1993;26(4):160–7.
37. Touwaide A. Méthodologie de l'ethnopharmacologie : Jacques Fleurentin (éd.), Pierre Cabalion (éd.), Guy Mazars (éd.), et al. *Ethnopharmacologie. Sources, méthodes, objectifs ...* In: *Revue d'histoire de la pharmacie, 81e année [Internet]*. 1993. p. 239–40. Available from: [http://www.persee.fr/doc/pharm\\_0035-2349\\_1993\\_num\\_81\\_297\\_3735\\_t1\\_0239\\_0000\\_2](http://www.persee.fr/doc/pharm_0035-2349_1993_num_81_297_3735_t1_0239_0000_2)
38. WENIGER B, BOURDY G. Ethnopharmacologie et innovation thérapeutique un défi pour le XXIe siècle ? *Biofutur*. 2008;290:41–4.
39. Kémajou A, Mba L, Bagda AA. Effet du séchage sur les principes actifs des plantes médicinales: cas des alcaloïdes totaux des écorces de *Alstonia boonei* Wild, plante antipaludéenne. *Rev "Nature Technol*. 2012;07:62–6.
40. Handa SS, Fermeglia M, Singh J, Singh AK, Tandon S, Rane S, et al. Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. 2008. 266 p.

41. Sarker SD, Latif Z, Gray AI. Natural Product Isolation. In: *Natural Products Isolation, Second Edition*. 2005. p. 1–26.
42. Erwanita. Bioassay-guided fractionation and identification of antioxidant and antimicrobial compounds from *Callistemon viminalis* (Gaertn.) G. Don. 2008.
43. Malviya N, Malviya S. Bioassay guided fractionation-an emerging technique influence the isolation, identification and characterization of lead phytomolecules. *Int J Hosp Pharm*. 2017;2(5):1–6.
44. Brake K, Gumireddy A, Tiwari A, Chauhan H, Kumari D. *In vivo* Studies for Drug Development via Oral Delivery: Challenges, Animal Models and Techniques. *Pharm Anal Acta*. 2017;08(09):1–11.
45. Gammon DB. *Caenorhabditis elegans* as an Emerging Model for Virus-Host Interactions. *J Virol*. 2017;91(23):1–7.
46. Foucaud-scheunemann C, Helinck S. Les micro-organismes au cœur des biotechnologies. *Tech l'ingénieur*. 2009;1–23.
47. Tan SY, Tatsumura Y. Alexander Fleming (1881–1955): Discoverer of penicillin. *Singapore Med J*. 2015;56(7):366–7.
48. Wang B, Yao M, Lv L, Ling Z, Li L. The Human Microbiota in Health and Disease. *Engineering [Internet]*. 2017;3:71–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/J.ENG.2017.01.008>
49. Chung H, Kasper DL. Microbiota-stimulated immune mechanisms to maintain gut homeostasis. *Curr Opin Immunol [Internet]*. 2010;22:455–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2010.06.008>
50. Tojo R, Suárez A, Clemente MG, De Los Reyes-Gavilán CG, Margolles A, Gueimonde M, et al. Intestinal microbiota in health and disease: Role of bifidobacteria in gut homeostasis. *World J Gastroenterol*. 2014;20(41):15163–76.
51. Bordenave G. Louis Pasteur (1822-1895). *Microbes Infect*. 2003;5:553–60.
52. 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;14(11):1–20.
53. Murakami T, Burian J, Yanai K, Bibb MJ, Thompson CJ. A system for the targeted amplification of bacterial gene clusters multiplies antibiotic yield in *Streptomyces*

- coelicolor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(38):16020–5.
54. Direction générale de la Santé. Déchets d'activité de soins à risques. 2009.
55. FDA. Generally Recognized as Safe (GRAS) [Internet]. 2019. Available from: <https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/generally-recognized-safe-gras>
56. Marco ML, Heeney D, Binda S, Cifelli CJ, Cotter PD, Foligné B, et al. Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Curr Opin Biotechnol*. 2017;44:94–102.
57. Dimidi E, Cox S, Rossi M, Whelan K. Fermented Foods: Definitions and Characteristics, Impact on the Gut Microbiota and Effects on Gastrointestinal Health and Disease. *Nutrients*. 2019;11(1806):1–26.
58. Nuraida L. A review: Health promoting lactic acid bacteria in traditional Indonesian fermented foods. *Food Sci Hum Wellness [Internet]*. 2015;4:47–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fshw.2015.06.001>
59. Chambres d'agriculture de Bretagne. La revue de l'observatoire des IAA de Bretagne. 2019.
60. Chilton SN, Burton JP, Reid G. Inclusion of Fermented Foods in Food Guides around the World. *Nutrients*. 2015;7:390–404.
61. Les types de fermentations [Internet]. Available from: [http://genet.univ-tours.fr/gen002300/DONNEES/biotechs\\_blanches/les\\_fermentations.htm](http://genet.univ-tours.fr/gen002300/DONNEES/biotechs_blanches/les_fermentations.htm)
62. Barasi ME. Human nutrition, a health perspective (2nd edition). 2003. 416 p.
63. Worsley A. Nutrition knowledge and food consumption: can nutrition knowledge change food behaviour? *Asia Pac J Clin Nutr*. 2002;11(Suppl 3):S579–85.
64. Kwon DY, Nyakudya E, Jeong YS. Fermentation: Food Products. *Encycl Agric Food Syst*. 2014;3:113–23.
65. Kim B, Hong VM, Yang J, Hyun H, Im JJ, Hwang J, et al. A Review of Fermented Foods with Beneficial Effects on Brain and Cognitive Function. *Prev Nutr Food Sci*. 2016;21(4):297–309.
66. Tamang JP, Kailasapathy K. Fermented Foods and Beverages of the World. *Fermented foods and beverages of the world*. 2010. 1–445 p.
67. Melini F, Melini V, Luziatelli F, Ficca AG, Ruzzi M. Health-Promoting Components in Fermented Foods: An Up-to-Date Systematic Review. *Nutrients*. 2019;11:1–24.
68. Fox PF. Cheese: An Overview. In: *PF Fox (eds) Cheese: Chemistry, Physics and*



- Microbiology*. 1993. p. 1–2.
69. Kindstedt PS. The history of cheese. In: *Global Cheesemaking Technology: Cheese Quality and Characteristics, First Edition*. 2018. p. 3–19.
70. Bogucki PI. Ceramic Sieves of the Linear Pottery Culture and Their Economic Implications. *Oxford J Archaeol*. 1984;3(1):15–30.
71. Salque M, Bogucki PI, Pyzel J, Sobkowiak-Tabaka I, Grygiel R, Szmyt M, et al. Earliest evidence for cheese making in the sixth millennium BC in northern Europe. *Nature*. 2012;000:1–4.
72. Todaro A, Adly FA, Omar OAH. History, Processing and Quality Enhancement of Traditional Egyptian Kariesh Cheese: A Review. *Food Sci Technol*. 2013;1(1):1–6.
73. The International Dairy Federation. The world dairy situation 2018. *Bulletin of the International Dairy Federation 494/2018*. 2018;
74. Dias C, Mendes L. Protected Designation of Origin (PDO), Protected Geographical Indication (PGI) and Traditional Speciality Guaranteed (TSG): A bibliometric analysis. *Food Res Int [Internet]*. 2018;103:492–508. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.059>
75. Institut National de l'Origine et de la Qualité. L'Appellation d'origine protégée. L'Appellation d'origine contrôlée. 2016.
76. CNAOL, CNIEL. Les A.O.P., La Plus Belle Preuve d'Authenticité.
77. Bouamra-Mechemache Z, Chaaban J. Determinants of Adoption of Protected Designation of Origin Label: Evidence from the French Brie Cheese Industry. *J Agric Econ*. 2010;61(2):225–39.
78. Cayre P, Michaud A, Theau JP, Rigolot C. The Coexistence of Multiple Worldviews in Livestock Farming Drives Agroecological Transition. A Case Study in French Protected Designation of Origin (PDO) Cheese Mountain Areas. *Sustainability*. 2018;10:1–13.
79. Marcoz EM, Melewar TC, Dennis C. The Value of Region of Origin, Producer and Protected Designation of Origin Label for Visitors and Locals: The Case of Fontina Cheese in Italy. *Int J Tour Res*. 2016;18:236–50.
80. ANSES. *Listeria monocytogenes*. 2011.
81. Grappin R, Beuvier E. Possible Implications of Milk Pasteurization on the Manufacture

- and Sensory Quality of Ripened Cheese. *Int Dairy J.* 1997;6946(98):751–61.
82. De Filippis F, La Stora A, Stellato G, Gatti M, Ercolini D. A Selected Core Microbiome Drives the Early Stages of Three Popular Italian Cheese Manufactures. *PLoS One.* 2014;9(2):1–8.
83. Montel MC, Buchin S, Mallet A, Delbes-Paus C, Vuitton DA, Desmasures N, et al. Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. *Int J Food Microbiol [Internet].* 2014;177:136–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019>
84. Stellato G, De Filippis F, La Stora A, Ercolini D. Coexistence of Lactic Acid Bacteria and Potential Spoilage Microbiota in a Dairy Processing Environment. *Appl Environ Microbiol.* 2015;81(22):7893–904.
85. Les produits Laitiers. Le fromage, son circuit de fabrication [Internet]. 2021. Available from: <https://www.produits-laitiers.com/le-fromage-son-circuit-de-fabrication/>
86. Vilain A-C. Qu'est-ce que le lait ? *Rev Fr Allergol.* 2010;50:124–7.
87. Karam M-C. Réhydratation des protéines laitières dans un milieu complexe : Influence de l'état d'hydratation sur les propriétés texturales des gels acides. 2013.
88. Walstra P. On the Stability of Casein Micelles. *J Dairy Sci.* 1990;73:1965–79.
89. De Kruif CG, Holt C. Casein micelle structure, functions and interactions. In: *Advanced Dairy Chemistry — Volume 1: Proteins [Internet].* 2003. p. 233–76. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-8602-3>
90. Quigley L, O'Sullivan O, Stanton C, Beresford TP, Ross RP, Fitzgerald GF, et al. The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiol Rev.* 2013;37:664–98.
91. Verdier-Metz I, Gagne G, Bornes S, Monsallier F, Veisseire P, Delbès-Paus C, et al. Cow Teat Skin, a Potential Source of Diverse Microbial Populations for Cheese Production. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(2):326–33.
92. Frétin M, Martin B, Rifa E, Isabelle VM, Pomiès D, Ferlay A, et al. Bacterial community assembly from cow teat skin to ripened cheeses is influenced by grazing systems. *Sci Rep.* 2018;8(200):1–11.
93. Oikonomou G, Addis MF, Chassard C, Nader-Macias MEF, Grant I, Delbès C, et al. Milk Microbiota: What Are We Exactly Talking About? *Front Microbiol.* 2020;11:1–15.

94. Kamimura BA, De Filippis F, Sant'Ana AS, Ercolini D. Large-scale mapping of microbial diversity in artisanal Brazilian cheeses. *Food Microbiol.* 2019;80:40–9.
95. Aldrete-Tapia A, Escobar-Ramírez MC, Tamplin ML, Hernández-Iturriaga M. High-throughput sequencing of microbial communities in Poro cheese, an artisanal Mexican cheese. *Food Microbiol.* 2014;44:136–41.
96. Kousta M, Mataragas M, Skandamis P, Drosinos EH. Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. *Food Control [Internet]*. 2010;21:805–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.11.015>
97. Claeys WL, Verraes C, Cardoen S, De Block J, Huyghebaert A, Raes K, et al. Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits. *Food Control [Internet]*. 2014;42:188–201. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.045>
98. Vázquez CV, Rojas MGV, Ramírez CA, Chávez-Servín JL, García-Gasca T, Ferriz Martínez RA, et al. Total phenolic compounds in milk from different species. Design of an extraction technique for quantification using the Folin-Ciocalteu method. *Food Chem.* 2015;176:480–6.
99. Noni I De, Battelli G. Terpenes and fatty acid profiles of milk fat and “Bitto” cheese as affected by transhumance of cows on different mountain pastures. *Food Chem.* 2008;109:299–309.
100. Fernandez C, Astier C, Rock E, Coulon JB, Berdagué JL. Characterization of milk by analysis of its terpene fractions. *Int J Food Sci Technol.* 2003;38:445–51.
101. Coppa M, Verdier-Metz I, Ferlay A, Pradel P, Didienne R, Farruggia A, et al. Effect of different grazing systems on upland pastures compared with hay diet on cheese sensory properties evaluated at different ripening times. *Int Dairy J [Internet]*. 2011;21:815–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.04.006>
102. Galina MA, Osnaya F, Cuchillo HM, Haenlein GFW. Cheese quality from milk of grazing or indoor fed Zebu cows and Alpine crossbred goats. *Small Rumin Res.* 2007;71:264–72.
103. Coppa M, Ferlay A, Monsallier F, Verdier-Metz I, Pradel P, Didienne R, et al. Milk fatty acid composition and cheese texture and appearance from cows fed hay or different grazing systems on upland pastures. *J Dairy Sci [Internet]*. 2011;94:1132–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2010-3510>

104. Martin B, Verdier-Metz I, Buchin S, Hurtaud C, Coulon JB. How do the nature of forages and pasture diversity influence the sensory quality of dairy livestock products? *Anim Sci.* 2005;81:205–12.
105. Agabriel C, Martin B, Sibra C, Bonnefoy J-C, Montel M-C, Didienné R, et al. Effect of dairy production systems on the sensory characteristics of Cantal cheeses: a plant-scale study. *Anim Res.* 2004;53:221–34.
106. Fernández-García E, Imhof M, Schlichtherle-Cerny H, Bosset JO, Nuñez M. Terpenoids and benzenoids in La Serena cheese made at different seasons of the year with a *Cynara cardunculus* extract as coagulant. *Int Dairy J.* 2008;18:147–57.
107. Coulon J-B, Martin B, Verdier-Metz I, Buchin S, Viallon C. Etude du lien entre terroir et produit dans le cas des fromages AOC : influence de la composition floristique des fourrages sur les caractéristiques chimiques et sensorielles des fromages affinés. *Renc Rech Ruminants.* 2000;7:304–7.
108. Ferlay A, Agabriel C, Sibra C, Journal C, Martin B, Chilliard Y. Tanker milk variability in fatty acids according to farm feeding and husbandry practices in a French semi-mountain area. *Dairy Sci Technol.* 2008;88:193–215.
109. Frétin M. Construction de la qualité sensorielle des fromages de type Cantal : rôle des interactions entre les communautés microbiennes et la composition de la matière grasse laitière des fromages. Université d’Auvergne; 2016.
110. Les produits Laitiers. Le lait, son circuit de fabrication [Internet]. 2021. Available from: <https://www.produits-laitiers.com/le-lait-un-produit-varie-avec-differentes-saveurs/>
111. Groupe d’étude des marchés de restauration collective et de nutrition. Specification Technique De L’Achat Public. Laits Et Produits Laitiers. 2009.
112. Beuvier E, Berthaud K, Cegarra S, Dasen A, Pochet S, Buchin S, et al. Ripening and Quality of Swiss-type Cheese Made from Raw, Pasteurized or Microfiltered Milk. *Int Dairy J.* 1997;7:311–23.
113. Pestana JM, Gennari A, Monteiro BW, Lehn DN, De Souza CFV. Effects of Pasteurization and Ultra-High Temperature Processes on Proximate Composition and Fatty Acid Profile in Bovine Milk. *Am J Food Technol.* 2015;10(6):265–72.
114. Buffa M, Guamis B, Royo C, Trujillo AJ. Microbiological changes throughout ripening of goat cheese made from raw, pasteurized and high-pressure-treated milk. *Food Microbiol.* 2001;18:45–51.

115. Richard J, Zadi H. Inventaire de la flore bactérienne dominante des Camemberts fabriqués avec du lait cru. *Lait*. 1983;63(623–624):25–42.
116. Morgan F, Bodin J-P, Gaborit P. Lien entre le niveau de lipolyse du lait de chèvre et la qualité sensorielle des fromages au lait cru ou pasteurisé. *Lait*. 2001;81:743–56.
117. Cornu A, Rabiau N, Kondjoyan N, Verdier-Metz I, Pradel P, Tournayre P, et al. Odour-active compound profiles in Cantal-type cheese: Effect of cow diet, milk pasteurization and cheese ripening. *Int Dairy J [Internet]*. 2009;19:588–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.04.008>
118. Rodríguez-Alonso P, Centeno JA, Garabal JI. Comparison of the volatile profiles of Arzúa-Ulloa and Tetilla cheeses manufactured from raw and pasteurized milk. *LWT - Food Sci Technol*. 2009;42:1722–8.
119. Troch T, Lefébure É, Baeten V, Colinet F, Gengler N, Sindic M. Cow milk coagulation: process description, variation factors and evaluation methodologies. A review. *Biotechnol Agron Soc Environ*. 2017;21(4):276–87.
120. Laithier C, Bonnes A, Barral J, Legrand P, Jouvét T, Birckner J, et al. Annexe 1 : Rappels des fondamentaux sur acidification/égouttage en pâtes pressées non cuites.
121. Fleet GH. Microorganisms in food ecosystems. *Int J Food Microbiol*. 1999;50:101–17.
122. Panouillé M, Cuvelier G, Baglieri AM, Bosc V, Michon C, Relkin P. Sciences de la Production et de la Transformation. UC3 Transformation. Fonctionnalités des ingrédients. 2015. p. 1–34.
123. Fournier I. Approche pour favoriser l'égouttage et la déminéralisation lors de la fabrication fromagère à partir de concentrés d'osmose inverse du lait. 2019.
124. Pangallo D, Šaková N, Koreňová J, Puškárová A, Kraková L, Valík L, et al. Microbial diversity and dynamics during the production of May bryndza cheese. *Int J Food Microbiol*. 2014;170:38–43.
125. Guinee TP. Salting and the role of salt in cheese. *Int J Dairy Technol*. 2004;57(2–3):99–109.
126. Guinee TP, Fox PF. Salt in Cheese: Physical, Chemical and Biological Aspects. In: *Cheese : Chemistry, Physics and Microbiology [Internet]*. Fourth Ed. Elsevier Ltd; 2017. p. 317–75. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874558X04800691%5C>
127. Piccoli B, Severac G. Le Cantal, un grand fromage unique, riche de sa diversité.

128. Prieto B, Franco I, Fresno JM, Bernardo A, Carballo J. Picon Bejes-Tresviso blue cheese: An overall biochemical survey throughout the ripening process. *Int Dairy J.* 2000;10:159–67.
129. Fuka MM, Wallisch S, Engel M, Welzl G, Havranek J, Schloter M. Dynamics of Bacterial Communities during the Ripening Process of Different Croatian Cheese Types Derived from Raw Ewe’s Milk Cheeses. *PLoS One.* 2013;8(11):1–10.
130. Ceugniz A, Taminiau B, Coucheney F, Jacques P, Delcenserie V, Daube G, et al. Use of a metagenetic approach to monitor the bacterial microbiota of “Tomme d’Orchies” cheese during the ripening process. *Int J Food Microbiol.* 2017;247:65–9.
131. McSweeney PLH. Biochemistry of Cheese Ripening. *Int J Dairy Technol.* 2004;57(2/3):127–44.
132. Hayaloglu AA. Cheese: Microbiology of Cheese. *Ref Modul Food Sci.* 2016;1–11.
133. Ash A, Wilbey A. The nutritional significance of cheese in the UK diet. *Int J Dairy Technol.* 2010;63(3):305–19.
134. López-Expósito I, Amigo L, Recio I. A mini-review on health and nutritional aspects of cheese with a focus on bioactive peptides. *Dairy Sci Technol.* 2012;92:419–38.
135. Le Maréchal C, Peton V, Plé C, Vroland C, Jardin J, Briard-Bion V, et al. Surface proteins of *Propionibacterium freudenreichii* are involved in its anti-inflammatory properties. *J Proteomics [Internet].* 2015;112:447–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2014.07.018>
136. Amdekar S, Kumar A, Singh V. Transcriptional activity of cytokines induced by oral administration of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* in experimental model of arthritis. *AIMS Mol Sci.* 2017;4(2):164–74.
137. Foligné B, Parayre S, Cheddani R, Famelart MH, Madec MN, Plé C, et al. Immunomodulation properties of multi-species fermented milks. *Food Microbiol.* 2016;53:60–9.
138. Maghsood F, Mirshafiey A, Farahani MM, Modarressi MH, Jafari P, Motevaseli E. Dual Effects of Cell Free Supernatants from *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus rhamnosus* GG in Regulation of MMP-9 by Up-Regulating *TIMP-1* and Down-Regulating CD147 in PMA-Differentiated THP-1 Cells. *Cell J.* 2018;19(4):559–66.
139. Kim N, Kunisawa J, Kweon MN, Eog Ji G, Kiyono H. Oral feeding of *Bifidobacterium*

- bifidum* (BGN4) prevents CD4<sup>+</sup> CD45RB<sup>high</sup> T cell-mediated inflammatory bowel disease by inhibition of disordered T cell activation. *Clin Immunol.* 2007;123:30–9.
140. Deutsch S-M, Parayre S, Bouchoux A, Guyomarc'h F, Dewulf J, Dols-Lafargue M, et al. Contribution of Surface  $\beta$ -Glucan Polysaccharide to Physicochemical and Immunomodulatory Properties of *Propionibacterium freudenreichii*. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78:1765–75.
141. Foligné B, Deutsch SM, Breton J, Cousin FJ, Dewulf J, Samson M, et al. Promising Immunomodulatory Effects of Selected Strains of Dairy Propionibacteria as Evidenced *In Vitro* and *In Vivo*. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(24):8259–64.
142. Duée M, Rebillard C. La dépendance des personnes âgées : une projection en 2040. In: *Données sociales–La société française [Internet]*. 2006. p. 613–9. Available from: [http://www.fedesap.fr/v2/documents/dependance des personnes agees une projection en 2040.pdf](http://www.fedesap.fr/v2/documents/dependance%20des%20personnes%20agees%20une%20projection%20en%202040.pdf)
143. Dugat-Bony E, Garnier L, Denonfoux J, Ferreira S, Sarthou AS, Bonnarme P, et al. Highlighting the microbial diversity of 12 French cheese varieties. *Int J Food Microbiol.* 2016;238:265–73.
144. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 1959;37(8):911–7.
145. Folch J, Lees M, Sloane Stanley G. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem.* 1957;226:497–509.
146. Manirakiza P, Covaci A, Schepens P. Comparative Study on Total Lipid Determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and Modified Bligh & Dyer Extraction Methods. *J Food Compos Anal.* 2001;14:93–100.
147. Polychroniadou A, Michaelidou A, Paschaloudis N. Effect of time, temperature and extraction method on the trichloroacetic acid-soluble nitrogen of cheese. *Int Dairy J.* 1999;9:559–68.
148. Huma N, Rafiq S, Sameen A, Pasha I, Khan MI. Antioxidant potential of buffalo and cow milk Cheddar cheeses to tackle human colon adenocarcinoma (Caco-2) cells. *Asian-Australasian J Anim Sci.* 2018;31(2):287–92.
149. Campos PB, Paulsen BS, Rehen SK. Accelerating neuronal aging in *in vitro* model brain disorders: a focus on reactive oxygen species. *Front Aging Neurosci.* 2014;6:1–10.

150. Litke R, Boulanger É, Fradin C. *Caenorhabditis elegans*, un modèle d'étude du vieillissement. *Medecine/Sciences*. 2018;34:571–9.
151. Galas S, Château M, Pomiès P, Wang J, Menardo J, Puel J, et al. Aperçu de la diversité des modèles animaux dédiés à l'étude du vieillissement. *Medecine/Sciences*. 2012;28:297–304.
152. Barrière A, Félix M-A. Isolation of *C. elegans* and related nematodes. In: *WormBook, ed The C elegans Research Community*. 2006. p. 1–9.
153. Couillault C, Leopold Kurz C. Du nématode *Caenorhabditis elegans* et de son utilisation en laboratoire. *Stal*. 2010;36:59–74.
154. Félix MA, Braendle C. The natural history of *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol [Internet]*. 2010;20(22):R965–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2010.09.050>
155. Poupet C. Caractérisation *in vivo* des propriétés antimicrobiennes de la souche probiotique Lcr35<sup>®</sup>. 2020.
156. Issi L, Rioux M, Rao R. The Nematode *Caenorhabditis elegans* - A Versatile *In Vivo* Model to Study Host-microbe Interactions. *J Vis Exp*. 2017;128:1–8.
157. Poupet C, Chassard C, Nivoliez A, Bornes S. *Caenorhabditis elegans*, a Host to Investigate the Probiotic Properties of Beneficial Microorganisms. *Front Nutr*. 2020;7:1–22.
158. The *C. elegans* Sequencing Consortium. Genome Sequence of the Nematode *C. elegans*: A Platform for Investigating Biology. *Science (80- )*. 1998;282(5396):2012–8.
159. Legouis R, Quintin S, Labouesse M. Séquençage du génome de *C. elegans* : les éclats du ver. *Medecine/Sciences*. 1999;15:695–700.
160. Finch CE, Ruvkun G. The Genetics of Aging. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2001;2:435–62.
161. Herbein G. Les voies de signalisation intracellulaire - Aspects généraux. In: *Réflexions rhumatologiques*. 2010. p. 8–12.
162. Millet ACM, Ewbank JJ. Immunity in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Opin Immunol*. 2004;16:4–9.
163. Roselli M, Schifano E, Guantario B, Zinno P, Uccelletti D, Devirgiliis C. *Caenorhabditis elegans* and Probiotics Interactions from a Prolongevity Perspective.



- Int J Mol Sci.* 2019;20(5020):1–14.
164. Ewbank JJ. Signaling in the immune response. In: *WormBook : the online review of C elegans biology.* 2006. p. 1–12.
165. Pastuhov SI, Hisamoto N, Matsumoto K. MAP kinase cascades regulating axon regeneration in *C. elegans*. *Proc Japan Acad Ser B.* 2015;91:63–75.
166. Nakahara T, Moroi Y, Uchi H, Furue M. Differential role of MAPK signaling in human dendritic cell maturation and Th1/Th2 engagement. *J Dermatol Sci.* 2006;42:1–11.
167. Held P. An Introduction to Reactive Oxygen Species: Measurement of ROS in Cells. *BioTek Instruments [Internet].* 2012;1–14. Available from: <http://www.biotek.com/resources/articles/reactive-oxygen-species.html>
168. Fatima S, Haque R, Jadiya P, 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):1–16.
169. Poupet C, Veisseire P, Bonnet M, Camarès O, Gachinat M, Dausset C, et al. Curative Treatment of Candidiasis by the Live Biotherapeutic Microorganism *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35<sup>®</sup> in the Invertebrate Model *Caenorhabditis elegans*: First Mechanistic Insights. *Microorganisms.* 2020;8(34):1–17.
170. 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;15:227–36.
171. Abdhul K, Ganesh M, Shanmughapriya S, Kanagavel M, Anbarasu K, Natarajaseenivasan K. Antioxidant activity of exopolysaccharide from probiotic strain *Enterococcus faecium* (BDU7) from Ngari. *Int J Biol Macromol [Internet].* 2014;70:450–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.07.026>
172. Gomez-Ruiz JA, Ballesteros C, Gonzales Vinas MA, Cabezas L, Martinez-Castro I. Relationships between volatile compounds and odour in Manchego cheese: comparison between artisanal and industrial cheeses at different ripening times. *Lait.* 2002;82:613–28.
173. Teply LJ, Derse PH, Price W V. Composition and Nutritive Value of Cheese Produced from Milk Treated with Hydrogen Peroxide and Catalase. *J Dairy Sci.* 1958;41:593–605.

174. Buchin S, Delague V, Duboz G, Berdague JL, Beuvier E, Pochet S, et al. Influence of Pasteurization and Fat Composition of Milk on the Volatile Compounds and Flavor Characteristics of a Semi-hard Cheese. *J Dairy Sci [Internet]*. 1998;81:3097–108. Available from: [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75874-6](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75874-6)
175. Panseri S, Giani I, Mentasti T, Bellagamba F, Caprino F, Moretti VM. Determination of flavour compounds in a mountain cheese by headspace sorptive extraction-thermal desorption-capillary gas chromatography-mass spectrometry. *LWT - Food Sci Technol*. 2008;41:185–92.
176. Yang E, Fan L, Jiang Y, Doucette C, Fillmore S. Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. *AMB Express*. 2012;2:1–12.
177. Cardin G, Ripoche I, Poupet C, Bonnet M, Veisseire P, Chalard P, et al. Development of an innovative methodology combining chemical fractionation and *in vivo* analysis to investigate the biological properties of cheese. *PLoS One [Internet]*. 2020;15(11):1–16. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242370>
178. Wardle J, Haase AM, Steptoe A, Nillapun M, Jonwutiwes K, Bellisle F. Gender Differences in Food Choice: The Contribution of Health Beliefs and Dieting. *Ann Behav Med*. 2004;27(2):107–16.
179. Spence JC, Cutumisu N, Edwards J, Raine KD, Smoyer-Tomic K. Relation between local food environments and obesity among adults. *BMC Public Health*. 2009;9(192):1–6.
180. Cardin G, Poupet C, Bonnet M, Veisseire P, Ripoche I, Chalard P, et al. A Mechanistic Study of the Antiaging Effect of Raw-Milk Cheese Extracts. *Nutrients*. 2021;13(897):1–26.
181. Taux de matière grasses dans les fromages.
182. Revello Chion A, Tabacco E, Giaccone D, Peiretti PG, Battelli G, Borreani G. Variation of fatty acid and terpene profiles in mountain milk and “Toma piemontese” cheese as affected by diet composition in different seasons. *Food Chem [Internet]*. 2010;121(2):393–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.048>
183. Martin-Hernández MC, Alonso L, Juárez M, Fontecha J. Gas chromatographic method for determining free fatty acids in cheese. *Chromatographia*. 1988;25(2):87–90.
184. Lavillonnière F, Martin JC, Bougnoux P, Sébédio JL. Analysis of conjugated linoleic

- acid isomers and content in French cheeses. *JAACS, J Am Oil Chem Soc.* 1998;75(3):343–52.
185. Giacomoni F, Le Corguillé G, Monsoor M, Landi M, Pericard P, Pétéra M, et al. Workflow4Metabolomics: A collaborative research infrastructure for computational metabolomics. *Bioinformatics.* 2015;31(9):1493–5.
186. Meira SMM, Daroit DJ, Helfer VE, Corrêa APF, Segalin J, Carro S, et al. Bioactive peptides in water-soluble extracts of ovine cheeses from Southern Brazil and Uruguay. *Food Res Int [Internet].* 2012;48:322–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.05.009>
187. Saito T, Nakamura T, Kitazawa H, Kawai Y, Itoh T. Isolation and Structural Analysis of Antihypertensive Peptides That Exist Naturally in Gouda Cheese. *J Dairy Sci [Internet].* 2000;83:1434–40. Available from: [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75013-2](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75013-2)
188. Domagała J, Sady M, Grega T, Pustkowiak H, Florkiewicz A. The influence of cheese type and fat extraction method on the content of conjugated linoleic acid. *J Food Compos Anal.* 2010;23:238–43.
189. Timón ML, Parra V, Otte J, Broncano JM, Petróñ MJ. Identification of radical scavenging peptides (<3 kDa) from Burgos-type cheese. *LWT - Food Sci Technol.* 2014;57:359–65.
190. Kristensen D, Hansen E, Arndal A, Trinderup RA, Skibsted LH. Influence of light and temperature on the colour and oxidative stability of processed cheese. *Int Dairy J.* 2001;11:837–43.
191. Katawal I, Kharel GP, Poudel BH. Antioxidant Activity and Cytotoxicity of Nepalese Nak Cheese. *Biol Chem Res.* 2016;3:234–45.
192. Falchero L, Lombardi G, Gorlier A, Lonati M, Odoardi M, Cavallero A. Variation in fatty acid composition of milk and cheese from cows grazed on two alpine pastures. *Dairy Sci Technol.* 2010;90:657–72.
193. Fontenele MA, Bastos M do SR, dos Santos KMO, Bemquerer MP, do Egito AS. Peptide profile of Coalho cheese: A contribution for Protected Designation of Origin (PDO). *Food Chem [Internet].* 2017;219:382–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.171>
194. Devenir éleveur-euse. La production de lait et de produits laitiers [Internet]. Available

- from: <https://devenir-eleveur.com/production-de-lait-de-produits-laitiers/>
195. Chapitre 7. Lait et produits laitiers. In: *Perspectives agricoles de l'OCDR et de la FAO*. 2019. p. 196–206.
  196. Foligné B, Breton J, Mater D, Jan G. Tracking the microbiome functionality: focus on *Propionibacterium* species. *Gut*. 2013;62(8):1227–8.
  197. Rodríguez C, Medici M, Mozzi F, de Valdez GF. Therapeutic effect of *Streptococcus thermophilus* CRL 1190-fermented milk on chronic gastritis. *World J Gastroenterol*. 2010;16(13):1622–30.
  198. Songisepp E, Kullisaar T, Hütt P, Elias P, Brilene T, Zilmer M, et al. A New Probiotic Cheese with Antioxidative and Antimicrobial Activity. *J Dairy Sci*. 2004;87(7):2017–23.
  199. Dilna SV, Surya H, Aswathy RG, Varsha KK, Sakthikumar DN, Pandey A, et al. Characterization of an exopolysaccharide with potential health-benefit properties from a probiotic *Lactobacillus plantarum* RJF4. *LWT - Food Sci Technol [Internet]*. 2015;64:1179–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.040>
  200. Venkatesh P, Balraj M, Ayyanna R, Ankaiah D, Arul V. Physicochemical and biosorption properties of novel exopolysaccharide produced by *Enterococcus faecalis*. *LWT - Food Sci Technol [Internet]*. 2016;68:606–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.01.005>
  201. S M, P V, S Saravanan, K T K A, ap, ian, et al. Structural characterization and biological activity of exopolysaccharide from *Lysinibacillus fusiformis*. *African J Microbiol Res*. 2013;7(38):4666–76.
  202. So JS, Song MK, Kwon HK, Lee CG, Chae CS, Sahoo A, et al. *Lactobacillus casei* enhances type II collagen/glucosamine-mediated suppression of inflammatory responses in experimental osteoarthritis. *Life Sci*. 2011;88:358–66.
  203. So JS, Kwon HK, Lee CG, Yi HJ, Park JA, Lim SY, et al. *Lactobacillus casei* suppresses experimental arthritis by down-regulating T helper 1 effector functions. *Mol Immunol*. 2008;45:2690–9.
  204. Kikuchi T, Yamada H, Shimmei M. Effect of high molecular weight hyaluron on cartilage degeneration in a rabbit model of osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil*. 1996;4:99–110.
  205. Nowak B, Ciszek-Lenda M, Śróttek M, Gamian A, Kontny E, Górska-Frączek S, et al.

- Lactobacillus rhamnosus* Exopolysaccharide Ameliorates Arthritis Induced by the Systemic Injection of Collagen and Lipopolysaccharide in DBA/1 Mice. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2012;60:211–20.
206. Tsuda H, Miyamoto T. Production of Exopolysaccharide by *Lactobacillus plantarum* and the Prebiotic Activity of the Exopolysaccharide. *Food Sci Technol Res*. 2010;16(1):87–92.

# *Annexes*

<i>Annexe 1. Données de la littérature recensant les activités biologiques bénéfiques pour la santé humaine et animale attribuées aux microorganismes et/ou à leurs métabolites.....</i>	<i>212</i>
<i>Annexe 2. Préparation des solutions et milieux de culture.....</i>	<i>215</i>
<i>Annexe 3. Script RMarkdown pour l'analyse des données de longévité du ver.....</i>	<i>218</i>

## Annexe 1.

### Données de la littérature recensant les activités biologiques bénéfiques pour la santé humaine et animale attribuées aux microorganismes et/ou à leurs métabolites

Nom de la souche	Activité	Type d'étude	Référence
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	Anti-inflammatoire	<i>In vitro</i> sur des PBMC	[135] [196]
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> ssp <i>shermanii</i>	Anti-inflammatoire	<i>In vitro</i> dans le milieu de culture de PBMC issues de patients ayant consommé la bactérie	[7]
<i>Bidifobacterium animalis</i> ssp <i>lactis</i>	Anti-inflammatoire	<i>In vitro</i> dans le milieu de culture de PBMC issues de patients ayant consommé la bactérie	[7]
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp <i>lactis</i>	Anti-inflammatoire	<i>In vitro</i> sur des cellules épithéliales humaines du colon HT-29, activées avec TNF- $\alpha$	[8]
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp <i>bulgaris</i>	Anti-inflammatoire	<i>In vitro</i> sur des cellules épithéliales humaines du colon HT-29, activées avec TNF- $\alpha$	[8]
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Anti-inflammatoire	<i>In vitro</i> sur des cellules épithéliales humaines du colon HT-29, activées avec TNF- $\alpha$	[8]
<i>Lactobacillus gasseri</i>	Anti-inflammatoire	<i>In vitro</i> sur des cellules épithéliales humaines du colon HT-29, activées	[8]

avec TNF- $\alpha$			
<i>Bifidobacterium longum</i>	Anti-inflammatoire	Utilisée comme souche de référence	[135,137,196]
<i>Lactobacillus salivarius</i>	Anti-inflammatoire	Utilisée comme souche de référence	[8,137,196]
<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>cremoris</i>	Anti-inflammatoire	<i>In vitro</i> dans le milieu de culture de PBMC	[137]
<i>Lactobacillus reuteri</i> <i>Lactobacillus paracasei</i>	Anti-inflammatoire	<i>In vivo</i> chez une souris avec une colite induite qui a consommé la bactérie	[30]
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Anti-inflammatoire	<i>In vivo</i> chez une souris avec une gastrite induite qui a consommé la bactérie	[197]
<i>Lactobacillus fermentum</i>	Antioxydante	Mesure de la capacité antioxydante des bactéries par des tests physico-chimiques	[198]
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Antioxydante	Mesure de la capacité antioxydante d'un EPS produit par la bactérie, à l'aide de tests physico-chimiques	[199]
<i>Enterococcus faecium</i>	Antioxydante	Mesure de la capacité antioxydante d'un EPS produit par la bactérie, à l'aide de tests physico-chimiques	[171]
<i>Enterococcus faecalis</i>	Antioxydante	Mesure de la capacité antioxydante d'un EPS produit par la bactérie, à l'aide de tests physico-chimiques	[200]
<i>Lysinbacillus fusiformis</i>	Antioxydante	Mesure de la capacité antioxydante d'un EPS produit par la bactérie, à l'aide de tests physico-chimiques	[201]



<i>Lactobacillus casei</i>	Anti-arthrosique	<i>In vivo</i> chez des souris et rats ayant une arthrose ou une arthrite induite ayant consommé la bactérie	[202,203]
<i>Streptococcus equi</i>	Anti-arthrosique	<i>In vivo</i> après avoir réalisé une injection intra-articulaire de hyaluron produit par la bactérie chez des lapins ayant une arthrose induite	[204]
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Anti-arthrosique	<i>In vivo</i> après avoir réalisé une injection intra-péritonéale d'EPS produit par la bactérie chez des souris ayant une arthrose induite	[205]
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Anti-arthrosique	<i>In vitro</i> sur l'ARN de monocytes différenciés en contact avec le milieu de culture des bactéries	[138]
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Antimicrobienne	Mesure <i>in vitro</i> de l'activité de cette souche bactérienne	[9]
<i>Enterococcus faecium</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus sakei ssp sakei</i>	Antimicrobienne	Mesure <i>in vitro</i> de l'activité de diverses souches bactériennes isolées d'un fromage	[176]
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Antimicrobienne	Mesure <i>in vitro</i> de l'activité d'un EPS produit par la bactérie	[206]

PBMC : Cellules mononuclées du sang périphériques

EPS : exopolysaccharide

TNF- $\alpha$  : facteur de nécrose tumorale

## Annexe 2.

# Préparation des solutions et milieux de culture

### 1) Préparation des solutions

#### Tampon M9 :

##### Composition pour 1 L de tampon :

- 3 g de phosphate monopotassique  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 6 g de phosphate dissodique  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- 5 g de chlorure de sodium  $\text{NaCl}$
- 0,25 g de sulfate de magnésium heptahydraté  $\text{MgSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$
- Ajuster à 1 L avec de l'eau distillée

Stériliser par autoclavage à 121 °C pendant 20 minutes. Stockage à 4 °C.

#### **Solution de chlorure de calcium ( $\text{CaCl}_2$ ) 1 M (50 mL) :**

- 5,55 g de chlorure de calcium  $\text{CaCl}_2$
- Ajuster à 50 mL avec de l'eau distillée

Autoclaver à 121 °C pendant 20 minutes.

#### **Solution de sulfate de magnésium ( $\text{MgSO}_4$ ) 1 M (50 mL) :**

- 6,02 g de sulfate de magnésium  $\text{MgSO}_4$
- Ajuster à 50 mL avec de l'eau distillée

Autoclaver à 121 °C pendant 20 minutes.

#### **Solution de tampon phosphate 1 M, pH = 6 (1 L) :**

- 108,3 g de phosphate monopotassique  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 35,6 g de phosphate dipotassique  $\text{K}_2\text{HPO}_4$
- Ajuster à 1L avec de l'eau distillée
- Ajuster à pH = 6

Stériliser par autoclavage à 121 °C pendant 20 minutes.

**Solution éthanolique de cholestérol à 5 mg.mL<sup>-1</sup> :**

- 0,025 g de cholestérol
- 50 mL d'éthanol pur

Vortexer jusqu'à dissolution complète. Ne pas autoclaver.

**Solution de fluorodesoxyuridine (FUdR) 6 mM :**

- 0,030 g de fluorodesoxyuridine FUdR
- 10 mL de tampon M9 à température ambiante

Vortexer jusqu'à dissolution complète et stériliser par filtration 0,22  $\mu$ m. Cette solution est à préparer avant utilisation, et à l'abri de la lumière si possible, le FUdR n'étant pas stable en solution.

## **2) Préparation des milieux**

**Milieu gélosé Nematode Growth Medium (NGM), pour entretien des souches de vers :**

Composition pour 1 L de milieu :

- 3 g de chlorure de sodium NaCl
- 17 g d'agar
- 2,5 g de peptone
- 4 g d'extrait de levure
- 975 mL d'eau distillée

Autoclaver à 121 °C pendant 20 minutes.

Après autoclavage, laisser refroidir le milieu de base dans un bain marie à 50 °C pendant 1 h puis ajouter stérilement :

- 1 mL de solution de CaCl<sub>2</sub>
- 1 mL de solution de cholestérol
- 1 mL de solution de MgSO<sub>4</sub>
- 25 mL de tampon phosphate pH=6
- Quantité adéquate de solution de FUdR pour obtenir une concentration finale de 0.12 mM de FUdR dans le milieu.

Bien agiter le milieu, le couler en boites de Pétri et laisser solidifier à température ambiante.

**Milieu gélosé Nematode Growth Medium (NGM), pour étude de l'impact des extraits de fromage et de lait (longévité, qPCR, survie sur milieu oxydant) :**

Composition pour 1 L de milieu :

- 3 g de chlorure de sodium NaCl
- 6 g d'agarose biomoléculaire
- 975 mL d'eau distillée

Autoclaver à 121°C pendant 20 minutes.

Après autoclavage, laisser refroidir le milieu de base dans un bain marie à 50 °C pendant 1 h puis ajouter stérilement la quantité adéquate de solution de FUdR pour obtenir une concentration finale de 0.12 mM de FUdR dans le milieu.

Bien agiter le milieu, le couler en boites de Pétri et laisser solidifier à température ambiante.

**Milieu gélosé Nematode Growth Medium (NGM), pour étude de l'impact des extraits de fromage sur le nématode mutant TJ356 (DAF-16::GFP) :**

Composition pour 1 L de milieu :

- 3 g de chlorure de sodium NaCl
- 6 g d'agarose biomoléculaire
- 975 mL d'eau distillée

Autoclaver à 121°C pendant 20 minutes.

Après autoclavage, laisser refroidir le milieu de base dans un bain marie à 50 °C pendant 1 h puis ajouter stérilement :

- 1 mL de solution de CaCl<sub>2</sub>
- 1 mL de solution de cholestérol
- 1 mL de solution de MgSO<sub>4</sub>
- 25 mL de tampon phosphate pH=6

Bien agiter le milieu, le couler en boites de Pétri et laisser solidifier à température ambiante.

# Annexe 3.

## Script RMarkdown pour l'analyse des données de longévité du ver

```

1 ---
2 title: "Analyse de l'effet d'extraits de fromage sur la longévité de C. elegans N2"
3 author: "Cyril Poupet & Guillaume CARDIN"
4 date: 'date: 13/09/2018'
5 output:
6   word_document: default
7   html_document:
8     number_sections: yes
9     toc: yes
10  pdf_document:
11    fig_caption: yes
12    keep_tex: yes
13    number_sections: yes
14    toc: yes
15 ---
16
17 ##{r Chargement des données, echo=FALSE, include=FALSE}
18 # chargement des packages
19 library("readxl")
20 library("survival")
21 library("survminer")
22 library("dplyr")
23
24 # Importation des données pour pour le témoin E. coli OP50
25 EcoliOP50 <- read_excel("datascript.xlsx",
26   sheet = "OP50")
27
28 # Importation des données pour pour le témoin E. coli OP50+antifongique
29 EcoliOP50AF <- read_excel("datascript.xlsx",
30   sheet = "OP50AF")
31
32 # Importation des données pour les tests expérimentaux
33
34 L18C1084_0.5 <- read_excel("datascript.xlsx",
35   sheet = "L18C1084_0.5")
36
37 R18C1099_0.5 <- read_excel("datascript.xlsx",
38   sheet = "R18C1099_0.5")
39
40 V19C1117_0.5 <- read_excel("datascript.xlsx",
41   sheet = "V19C1117_0.5")
42
43 V19C1117_0.1 <- read_excel("datascript.xlsx",
44   sheet = "V19C1117_0.1")
45
46 V19C1125_0.5 <- read_excel("datascript.xlsx",
47   sheet = "V19C1125_0.5")
48
49 V19C1125_0.1 <- read_excel("datascript.xlsx",
50   sheet = "V19C1125_0.1")
51
52 V19C1127_0.5 <- read_excel("datascript.xlsx",
53   sheet = "V19C1127_0.5")
54
55 V19C1127_1 <- read_excel("datascript.xlsx",
56   sheet = "V19C1127_1")
57
58 V19C1127_2 <- read_excel("datascript.xlsx",
59   sheet = "V19C1127_2")
60
61 V19C1131_0.5 <- read_excel("datascript.xlsx",
62   sheet = "V19C1131_0.5")
63
64 V19C1131_1 <- read_excel("datascript.xlsx",
65   sheet = "V19C1131_1")
66
67 V19C1131_2 <- read_excel("datascript.xlsx",
68   sheet = "V19C1131_2")
69
70 V19C1133_0.5 <- read_excel("datascript.xlsx",
71   sheet = "V19C1133_0.5")
72
73 V19C1133_1 <- read_excel("datascript.xlsx",
74   sheet = "V19C1133_1")
75
76 V19C1133_2 <- read_excel("datascript.xlsx",
77   sheet = "V19C1133_2")
78
79
80 # Validation des réplicas
81
82 fit_EcoliOP50 <- survfit(Surv(Temps, Statut)~Rep.inter, data=EcoliOP50)
83 summary(fit_EcoliOP50)$table
84
85 pEcoliOP50<-ggsurvplot(fit_EcoliOP50, pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int = FALSE, title = "Condition contrôle E. coli OP50",
86   xlab = "Temps en jours", ylab = "Probabilité de survie", surv.median.line = "hv", ggtheme = theme_bw(), legend.title =
87   "Réplicats", legend.labs = c("R1", "R2", "R3", "R4"), palette = c("red", "blue", "green", "purple"), legend=c(0.2,0.2),
88   break.time.by=2, font.x=c("bold"), font.y=c("bold"), font.tickslab=c("bold"))
89
90 fit_EcoliOP50AF <- survfit(Surv(Temps, Statut)~Rep.inter, data=EcoliOP50AF)
91 summary(fit_EcoliOP50AF)$table
92
93 pEcoliOP50AF<-ggsurvplot(fit_EcoliOP50AF, pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int = FALSE, title = "Condition contrôle E. coli OP50 HK + antifongique",
94   xlab = "Temps en jours", ylab = "Probabilité de survie", surv.median.line = "hv", ggtheme = theme_bw(), legend.title =
95   "Réplicats", legend.labs = c("R1", "R2", "R3", "R4"), palette = c("red", "blue", "green", "purple"), legend=c(0.2,0.2),
96   break.time.by=2, font.x=c("bold"), font.y=c("bold"), font.tickslab=c("bold"))
97
98 fit_L18C1084_0.5 <- survfit(Surv(Temps, Statut)~Rep.inter, data=L18C1084_0.5)
99 summary(fit_L18C1084_0.5)$table
100
101 pL18C1084_0.5<-ggsurvplot(fit_L18C1084_0.5, pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int = FALSE, title = "Condition L18C1084 0.5%",
102   xlab = "Temps en jours", ylab = "Probabilité de survie", surv.median.line = "hv", ggtheme = theme_bw(), legend.title =
103   "Réplicats", legend.labs = c("R1", "R2", "R3", "R4"), palette = c("red", "blue", "green", "purple"), legend=c(0.2,0.2),
104   break.time.by=2, font.x=c("bold"), font.y=c("bold"), font.tickslab=c("bold"))
105
106 fit_R18C1099_0.5 <- survfit(Surv(Temps, Statut)~Rep.inter, data=R18C1099_0.5)
107 summary(fit_R18C1099_0.5)$table
108
109 pR18C1099_0.5<-ggsurvplot(fit_R18C1099_0.5, pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int = FALSE, title = "Condition R18C1099 0.5%",
110   xlab = "Temps en jours", ylab = "Probabilité de survie", surv.median.line = "hv", ggtheme = theme_bw(), legend.title =
111   "Réplicats", legend.labs = c("R1", "R2", "R3", "R4"), palette = c("red", "blue", "green", "purple"), legend=c(0.2,0.2),
112   break.time.by=2, font.x=c("bold"), font.y=c("bold"), font.tickslab=c("bold"))

```

```

101
102 fit_v19C1117_0.1 <- survfit(Surv(Temps, Statut)~Rep.inter, data=v19C1117_0.1)
103 summary(fit_v19C1117_0.1)$table
104
105 pv19C1117_0.1<-ggsurvplot(fit_v19C1117_0.1, pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int = FALSE, title = "Condition v19C1117 0.1%",
xlab = "Temps en jours", ylab = "Probabilité de survie", surv.median.line = 'hv', ggtheme = theme_bw(), legend.title =
"Réplicats", legend.labs = c("R1","R2","R3","R4"), palette = c("red","blue","green","purple"), legend=c(0.2,0.2),
break.time.by=2, font.x=c("bold"), font.y=c("bold"), font.tickslab=c("bold"))
106
107
108 fit_v19C1117_0.5 <- survfit(Surv(Temps, Statut)~Rep.inter, data=v19C1117_0.5)
109 summary(fit_v19C1117_0.5)$table
110
111 pv19C1117_0.5<-ggsurvplot(fit_v19C1117_0.5, pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int = FALSE, title = "Condition v19C1117 0.5%",
xlab = "Temps en jours", ylab = "Probabilité de survie", surv.median.line = 'hv', ggtheme = theme_bw(), legend.title =
"Réplicats", legend.labs = c("R1","R2","R3","R4"), palette = c("red","blue","green","purple"), legend=c(0.2,0.2),
break.time.by=2, font.x=c("bold"), font.y=c("bold"), font.tickslab=c("bold"))
112
113
114 fit_v19C1125_0.5 <- survfit(Surv(Temps, Statut)~Rep.inter, data=v19C1125_0.5)
115 summary(fit_v19C1125_0.5)$table
116
117 pv19C1125_0.5<-ggsurvplot(fit_v19C1125_0.5, pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int = FALSE, title = "Condition v19C1125 0.5%",
xlab = "Temps en jours", ylab = "Probabilité de survie", surv.median.line = 'hv', ggtheme = theme_bw(), legend.title =
"Réplicats", legend.labs = c("R1","R2","R3","R4"), palette = c("red","blue","green","purple"), legend=c(0.2,0.2),
break.time.by=2, font.x=c("bold"), font.y=c("bold"))
118
119 fit_v19C1125_0.1 <- survfit(Surv(Temps, Statut)~Rep.inter, data=v19C1125_0.1)
120 summary(fit_v19C1125_0.1)$table
121
122 pv19C1125_0.1<-ggsurvplot(fit_v19C1125_0.1, pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int = FALSE, title = "Condition v19C1125 0.1%",
xlab = "Temps en jours", ylab = "Probabilité de survie", surv.median.line = 'hv', ggtheme = theme_bw(), legend.title =
"Réplicats", legend.labs = c("R1","R2","R3","R4"), palette = c("red","blue","green","purple"), legend=c(0.2,0.2),
break.time.by=2, font.x=c("bold"), font.y=c("bold"))
123
124 fit_v19C1127_0.5 <- survfit(Surv(Temps, Statut)~Rep.inter, data=v19C1127_0.5)
125 summary(fit_v19C1127_0.5)$table
126
127 pv19C1127_0.5<-ggsurvplot(fit_v19C1127_0.5, pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int = FALSE, title = "Condition v19C1127 0.5%",
xlab = "Temps en jours", ylab = "Probabilité de survie", surv.median.line = 'hv', ggtheme = theme_bw(), legend.title =
"Réplicats", legend.labs = c("R1","R2","R3","R4"), palette = c("red","blue","green","purple"), legend=c(0.2,0.2),
break.time.by=2, xlim=c(0,25), font.x=c("bold"), font.y=c("bold"), font.tickslab=c("bold"))
128
129 fit_v19C1127_1 <- survfit(Surv(Temps, Statut)~Rep.inter, data=v19C1127_1)
130 summary(fit_v19C1127_1)$table
131
132 pv19C1127_1<-ggsurvplot(fit_v19C1127_1, pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int = FALSE, title = "Condition v19C1127 1%", xlab
= "Temps en jours", ylab = "Probabilité de survie", surv.median.line = 'hv', ggtheme = theme_bw(), legend.title =
"Réplicats", legend.labs = c("R1","R2","R3","R4"), palette = c("red","blue","green","purple"), legend=c(0.2,0.2),
break.time.by=2, xlim=c(0,25), font.x=c("bold"), font.y=c("bold"), font.tickslab=c("bold"))
133
134 fit_v19C1127_2 <- survfit(Surv(Temps, Statut)~Rep.inter, data=v19C1127_2)
135 summary(fit_v19C1127_2)$table
136
137 pv19C1127_2<-ggsurvplot(fit_v19C1127_2, pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int = FALSE, title = "Condition v19C1127 2%", xlab
= "Temps en jours", ylab = "Probabilité de survie", surv.median.line = 'hv', ggtheme = theme_bw(), legend.title =
"Réplicats", legend.labs = c("R1","R2","R3","R4"), palette = c("red","blue","green","purple"), legend=c(0.2,0.2),
break.time.by=2, xlim=c(0,25), font.x=c("bold"), font.y=c("bold"), font.tickslab=c("bold"))
138
139 fit_v19C1131_0.5 <- survfit(Surv(Temps, Statut)~Rep.inter, data=v19C1131_0.5)
140 summary(fit_v19C1131_0.5)$table
141
142 pv19C1131_0.5<-ggsurvplot(fit_v19C1131_0.5, pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int = FALSE, title = "Condition v19C1131 0.5%",
xlab = "Temps en jours", ylab = "Probabilité de survie", surv.median.line = 'hv', ggtheme = theme_bw(), legend.title =
"Réplicats", legend.labs = c("R1","R2","R3","R4"), palette = c("red","blue","green","purple"), legend=c(0.2,0.2),
break.time.by=2, xlim=c(0,25), font.x=c("bold"), font.y=c("bold"), font.tickslab=c("bold"))
143
144
145 fit_v19C1131_1 <- survfit(Surv(Temps, Statut)~Rep.inter, data=v19C1131_1)
146 summary(fit_v19C1131_1)$table
147
148 pv19C1131_1<-ggsurvplot(fit_v19C1131_1, pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int = FALSE, title = "Condition v19C1131 1%", xlab
= "Temps en jours", ylab = "Probabilité de survie", surv.median.line = 'hv', ggtheme = theme_bw(), legend.title =
"Réplicats", legend.labs = c("R1","R2","R3","R4"), palette = c("red","blue","green","purple"), legend=c(0.2,0.2),
break.time.by=2, xlim=c(0,25), font.x=c("bold"), font.y=c("bold"), font.tickslab=c("bold"))
149
150 fit_v19C1131_2 <- survfit(Surv(Temps, Statut)~Rep.inter, data=v19C1131_2)
151 summary(fit_v19C1131_2)$table
152
153 pv19C1131_2<-ggsurvplot(fit_v19C1131_2, pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int = FALSE, title = "Condition v19C1131 2%", xlab
= "Temps en jours", ylab = "Probabilité de survie", surv.median.line = 'hv', ggtheme = theme_bw(), legend.title =
"Réplicats", legend.labs = c("R1","R2","R3","R4"), palette = c("red","blue","green","purple"), legend=c(0.2,0.2),
break.time.by=2, xlim=c(0,25), font.x=c("bold"), font.y=c("bold"), font.tickslab=c("bold"))
154
155 fit_v19C1133_0.5 <- survfit(Surv(Temps, Statut)~Rep.inter, data=v19C1133_0.5)
156 summary(fit_v19C1133_0.5)$table
157
158 pv19C1133_0.5<-ggsurvplot(fit_v19C1133_0.5, pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int = FALSE, title = "Condition v19C1133 0.5%",
xlab = "Temps en jours", ylab = "Probabilité de survie", surv.median.line = 'hv', ggtheme = theme_bw(), legend.title =
"Réplicats", legend.labs = c("R1","R2","R3","R4"), palette = c("red","blue","green","purple"), legend=c(0.2,0.2),
break.time.by=2, xlim=c(0,25), font.x=c("bold"), font.y=c("bold"), font.tickslab=c("bold"))
159
160 fit_v19C1133_1 <- survfit(Surv(Temps, Statut)~Rep.inter, data=v19C1133_1)
161 summary(fit_v19C1133_1)$table
162
163 pv19C1133_1<-ggsurvplot(fit_v19C1133_1, pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int = FALSE, title = "Condition v19C1133 1%", xlab
= "Temps en jours", ylab = "Probabilité de survie", surv.median.line = 'hv', ggtheme = theme_bw(), legend.title =
"Réplicats", legend.labs = c("R1","R2","R3","R4"), palette = c("red","blue","green","purple"), legend=c(0.2,0.2),
break.time.by=2, xlim=c(0,25), font.x=c("bold"), font.y=c("bold"), font.tickslab=c("bold"))
164
165 fit_v19C1133_2 <- survfit(Surv(Temps, Statut)~Rep.inter, data=v19C1133_2)
166 summary(fit_v19C1133_2)$table
167
168 pv19C1133_2<-ggsurvplot(fit_v19C1133_2, pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int = FALSE, title = "Condition v19C1133 2%", xlab
= "Temps en jours", ylab = "Probabilité de survie", surv.median.line = 'hv', ggtheme = theme_bw(), legend.title =
"Réplicats", legend.labs = c("R1","R2","R3","R4"), palette = c("red","blue","green","purple"), legend=c(0.2,0.2),
break.time.by=2, xlim=c(0,25), font.x=c("bold"), font.y=c("bold"), font.tickslab=c("bold"))

```

```

169
170 print(pEcoliOP50)
171 summary(fit_EcoliOP50)$table
172 survdiff(formula=Surv(Temps, Statut)--Rep.inter,data=EcoliOP50)
173
174 print(pEcoliOP50AF)
175 summary(fit_EcoliOP50AF)$table
176 survdiff(formula=Surv(Temps, Statut)--Rep.inter,data=EcoliOP50AF)
177
178 print(pL18C1084_0.5)
179 summary(fit_L18C1084_0.5)$table
180 survdiff(formula=Surv(Temps, Statut)--Rep.inter,data=L18C1084_0.5)
181
182 print(pR18C1099_0.5)
183 summary(fit_R18C1099_0.5)$table
184 survdiff(formula=Surv(Temps, Statut)--Rep.inter,data=R18C1099_0.5)
185
186 print(pV19C1117_0.1)
187 summary(fit_V19C1117_0.1)$table
188 survdiff(formula=Surv(Temps, Statut)--Rep.inter,data=V19C1117_0.1)
189
190 print(pV19C1117_0.5)
191 summary(fit_V19C1117_0.5)$table
192 survdiff(formula=Surv(Temps, Statut)--Rep.inter,data=V19C1117_0.5)
193
194 print(pV19C1125_0.1)
195 summary(fit_V19C1125_0.1)$table
196 survdiff(formula=Surv(Temps, Statut)--Rep.inter,data=V19C1125_0.1)
197
198 print(pV19C1125_0.5)
199 summary(fit_V19C1125_0.5)$table
200 survdiff(formula=Surv(Temps, Statut)--Rep.inter,data=V19C1125_0.5)
201
202 print(pV19C1127_0.5)
203 summary(fit_V19C1127_0.5)$table
204 survdiff(formula=Surv(Temps, Statut)--Rep.inter,data=V19C1127_0.5)
205
206 print(pV19C1127_1)
207 summary(fit_V19C1127_1)$table
208 survdiff(formula=Surv(Temps, Statut)--Rep.inter,data=V19C1127_1)
209
210 print(pV19C1127_2)
211 summary(fit_V19C1127_2)$table
212 survdiff(formula=Surv(Temps, Statut)--Rep.inter,data=V19C1127_2)
213
214 print(pV19C1131_0.5)
215 summary(fit_V19C1131_0.5)$table
216 survdiff(formula=Surv(Temps, Statut)--Rep.inter,data=V19C1131_0.5)
217
218 print(pV19C1131_1)
219 summary(fit_V19C1131_1)$table
220 survdiff(formula=Surv(Temps, Statut)--Rep.inter,data=V19C1131_1)

```

```

221
222 print(pV19C1131_2)
223 summary(fit_V19C1131_2)$table
224 survdiff(formula=Surv(Temps, Statut)--Rep.inter,data=V19C1131_2)
225
226 print(pV19C1133_0.5)
227 summary(fit_V19C1133_0.5)$table
228 survdiff(formula=Surv(Temps, Statut)--Rep.inter,data=V19C1133_0.5)
229
230 print(pV19C1133_1)
231 summary(fit_V19C1133_1)$table
232 survdiff(formula=Surv(Temps, Statut)--Rep.inter,data=V19C1133_1)
233
234 print(pV19C1133_2)
235 summary(fit_V19C1133_2)$table
236 survdiff(formula=Surv(Temps, Statut)--Rep.inter,data=V19C1133_2)
237
238 # Comparaison des conditions
239
240 bilan <- dplyr::full_join(EcoliOP50,EcoliOP50AF)
241 bilan <- dplyr::full_join(bilan,L18C1084_0.5)
242 bilan <- dplyr::full_join(bilan,R18C1099_0.5)
243 bilan <- dplyr::full_join(bilan,V19C1117_0.1)
244 bilan <- dplyr::full_join(bilan,V19C1117_0.5)
245 bilan <- dplyr::full_join(bilan,V19C1125_0.1)
246 bilan <- dplyr::full_join(bilan,V19C1125_0.5)
247 bilan <- dplyr::full_join(bilan,V19C1127_0.5)
248 bilan <- dplyr::full_join(bilan,V19C1127_1)
249 bilan <- dplyr::full_join(bilan,V19C1127_2)
250 bilan <- dplyr::full_join(bilan,V19C1131_0.5)
251 bilan <- dplyr::full_join(bilan,V19C1131_1)
252 bilan <- dplyr::full_join(bilan,V19C1131_2)
253 bilan <- dplyr::full_join(bilan,V19C1133_0.5)
254 bilan <- dplyr::full_join(bilan,V19C1133_1)
255 bilan <- dplyr::full_join(bilan,V19C1133_2)
256
257 fit_bilan <- survfit(Surv(Temps, Statut)--Souche, data=bilan)
258 p_bilan<-ggsvplot(fit_bilan, pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int = FALSE, title = "Effets d'extraits de fromage sur la
longévité de c. elegans N2", xlab = "Temps (jours)", ylab = "Probabilité de survie", surv.median.line = 'hv', ggtheme =
theme_bw(), legend.title = "Conditions", legend.labs = c("L18C1084 (0.5%)", "E. coli OP50 HK", "E. coli OP50 HK +
antifongique", "R18C1099 (0.5%)", "V19C1117 (0.1%)", "V19C1117 (0.5%)", "V19C1125 (0.1%)", "V19C1125 (0.5%)", "V19C1127
(0.5%)", "V19C1127 (1%)", "V19C1127 (2%)", "V19C1131 (0.5%)", "V19C1131 (1%)", "V19C1131 (2%)", "V19C1133 (0.5%)", "V19C1133
(1%)", "V19C1133 (2%)"), palette =
c("blue", "black", "black", "red", "orange", "orange", "purple", "purple", "green", "green", "green", "cyan", "cyan", "cyan", "pink", "pink",
"pink"), linetype = c("solid", "solid", "dashed", "solid", "dashed", "solid", "dashed", "solid", "dotted", "dashed",
"solid", "dotted", "dashed", "solid", "dotted"), legend=c(0.93,0.75), break.time.by=1, xlim=c(0,25), font.x=c("bold"),
font.y=c("bold"), font.tickslab=c("bold"))

```

```

259
260 EcolioP50_EcolioP50AF<-filter (Bilan,Souche=="OP50"|Souche=="OP50AF")
261 EcolioP50_L18C1084_0.5<-filter (Bilan,Souche=="OP50"|Souche=="L18C1084_0.5")
262 EcolioP50_R18C1099_0.5<-filter (Bilan,Souche=="OP50"|Souche=="R18C1099_0.5")
263 EcolioP50_V19C1117_0.1<-filter (Bilan,Souche=="OP50"|Souche=="V19C1117_0.1")
264 EcolioP50_V19C1117_0.5<-filter (Bilan,Souche=="OP50"|Souche=="V19C1117_0.5")
265 EcolioP50_V19C1125_0.1<-filter (Bilan,Souche=="OP50"|Souche=="V19C1125_0.1")
266 EcolioP50_V19C1125_0.5<-filter (Bilan,Souche=="OP50"|Souche=="V19C1125_0.5")
267 EcolioP50_V19C1127_0.5<-filter (Bilan,Souche=="OP50"|Souche=="V19C1127_0.5")
268 EcolioP50_V19C1127_1<-filter (Bilan,Souche=="OP50"|Souche=="V19C1127_1")
269 EcolioP50_V19C1127_2<-filter (Bilan,Souche=="OP50"|Souche=="V19C1127_2")
270 EcolioP50_V19C1131_0.5<-filter (Bilan,Souche=="OP50"|Souche=="V19C1131_0.5")
271 EcolioP50_V19C1131_1<-filter (Bilan,Souche=="OP50"|Souche=="V19C1131_1")
272 EcolioP50_V19C1131_2<-filter (Bilan,Souche=="OP50"|Souche=="V19C1131_2")
273 EcolioP50_V19C1133_0.5<-filter (Bilan,Souche=="OP50"|Souche=="V19C1133_0.5")
274 EcolioP50_V19C1133_1<-filter (Bilan,Souche=="OP50"|Souche=="V19C1133_1")
275 EcolioP50_V19C1133_2<-filter (Bilan,Souche=="OP50"|Souche=="V19C1133_2")
276
277 EcolioP50AF_L18C1084_0.5<-filter (Bilan,Souche=="OP50AF"|Souche=="L18C1084_0.5")
278 EcolioP50AF_V19C1117_0.1<-filter (Bilan,Souche=="OP50AF"|Souche=="V19C1117_0.1")
279 EcolioP50AF_V19C1117_0.5<-filter (Bilan,Souche=="OP50AF"|Souche=="V19C1117_0.5")
280
281
282 V19C1117_0.1_V19C1117_0.5<-filter (Bilan,Souche=="V19C1117_0.1"|Souche=="V19C1117_0.5")
283 V19C1125_0.1_V19C1125_0.5<-filter (Bilan,Souche=="V19C1125_0.1"|Souche=="V19C1125_0.5")
284 V19C1127_0.5_V19C1127_1<-filter (Bilan,Souche=="V19C1127_0.5"|Souche=="V19C1127_1")
285 V19C1127_0.5_V19C1127_2<-filter (Bilan,Souche=="V19C1127_0.5"|Souche=="V19C1127_2")
286 V19C1127_1_V19C1127_2<-filter (Bilan,Souche=="V19C1127_1"|Souche=="V19C1127_2")
287 V19C1131_0.5_V19C1131_1<-filter (Bilan,Souche=="V19C1131_0.5"|Souche=="V19C1131_1")
288 V19C1131_0.5_V19C1131_2<-filter (Bilan,Souche=="V19C1131_0.5"|Souche=="V19C1131_2")
289 V19C1131_1_V19C1131_2<-filter (Bilan,Souche=="V19C1131_1"|Souche=="V19C1131_2")
290 V19C1133_0.5_V19C1133_1<-filter (Bilan,Souche=="V19C1133_0.5"|Souche=="V19C1133_1")
291 V19C1133_0.5_V19C1133_2<-filter (Bilan,Souche=="V19C1133_0.5"|Souche=="V19C1133_2")
292 V19C1133_1_V19C1133_2<-filter (Bilan,Souche=="V19C1133_1"|Souche=="V19C1133_2")
293
294 V19C1127_0.5_V19C1131_0.5<-filter (Bilan,Souche=="V19C1127_0.5"|Souche=="V19C1131_0.5")
295 V19C1127_0.5_V19C1133_0.5<-filter (Bilan,Souche=="V19C1127_0.5"|Souche=="V19C1133_0.5")
296 V19C1131_0.5_V19C1133_0.5<-filter (Bilan,Souche=="V19C1131_0.5"|Souche=="V19C1133_0.5")
297 V19C1127_1_V19C1131_1<-filter (Bilan,Souche=="V19C1127_1"|Souche=="V19C1131_1")
298 V19C1127_1_V19C1133_1<-filter (Bilan,Souche=="V19C1127_1"|Souche=="V19C1133_1")
299 V19C1131_1_V19C1133_1<-filter (Bilan,Souche=="V19C1131_1"|Souche=="V19C1133_1")
300 V19C1127_2_V19C1131_2<-filter (Bilan,Souche=="V19C1127_2"|Souche=="V19C1131_2")
301 V19C1127_2_V19C1133_2<-filter (Bilan,Souche=="V19C1127_2"|Souche=="V19C1133_2")
302 V19C1131_2_V19C1133_2<-filter (Bilan,Souche=="V19C1131_2"|Souche=="V19C1133_2")
303
304 print(pBilan)
305
306 # Analyses statistiques
307
308 summary(fit_Bilan)$table
309 survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=EcolioP50_EcolioP50AF)
310 survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=EcolioP50_L18C1084_0.5)
311 survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=EcolioP50_R18C1099_0.5)
312 survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=EcolioP50_V19C1117_0.1)
313 survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=EcolioP50_V19C1117_0.5)
314 survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=EcolioP50_V19C1125_0.1)
315 survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=EcolioP50_V19C1125_0.5)
316 survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=EcolioP50_V19C1127_0.5)
317 survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=EcolioP50_V19C1127_1)
318 survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=EcolioP50_V19C1127_2)
319 survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=EcolioP50_V19C1131_0.5)
320 survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=EcolioP50_V19C1131_1)
321 survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=EcolioP50_V19C1131_2)
322 survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=EcolioP50_V19C1133_0.5)
323 survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=EcolioP50_V19C1133_1)
324 survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=EcolioP50_V19C1133_2)
325
326 survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=EcolioP50AF_L18C1084_0.5)
327 survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=EcolioP50AF_V19C1117_0.1)
328 survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=EcolioP50AF_V19C1117_0.5)
329
330 survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=V19C1117_0.1_V19C1117_0.5)
331 survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=V19C1125_0.1_V19C1125_0.5)
332 survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=V19C1127_0.5_V19C1127_1)
333 survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=V19C1127_0.5_V19C1127_2)
334 survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=V19C1127_1_V19C1127_2)
335 survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=V19C1131_0.5_V19C1131_1)
336 survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=V19C1131_0.5_V19C1131_2)
337 survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=V19C1131_1_V19C1131_2)
338 survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=V19C1133_0.5_V19C1133_1)
339 survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=V19C1133_0.5_V19C1133_2)
340 survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=V19C1133_1_V19C1133_2)
341
342 survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=V19C1127_0.5_V19C1131_0.5)
343 survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=V19C1127_0.5_V19C1133_0.5)
344 survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=V19C1131_0.5_V19C1133_0.5)
345 survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=V19C1127_1_V19C1131_1)
346 survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=V19C1127_1_V19C1133_1)
347 survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=V19C1131_1_V19C1133_1)
348 survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=V19C1127_2_V19C1131_2)
349 survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=V19C1127_2_V19C1133_2)
350 survdiff(formula = Surv(Temps, Statut)~Souche, data=V19C1131_2_V19C1133_2)
351

```



```

352 # Courbes de comparaison avec les témoins
353
354 BilanL18C1084 <- dplyr::full_join(EcolioP50AF,L18C1084_0.5)
355
356 fit_BilanL18C1084 <- survfit(Surv(Temps, Statut)~Souche, data=BilanL18C1084)
357 pBilanL18C1084<-ggsurvplot(fit_BilanL18C1084, pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int = FALSE, title = "Effets du fromage sur
la longévité de c. elegans N2", xlab = "Temps (jours)", ylab = "Probabilité de survie", surv.median.line = 'hv', ggtheme =
theme_bw(), legend.title = "Conditions", legend.labs = c("Fromage lyophilisé (0.5%)", "Témoïn 2"), palette =
c("blue", "black"), linetype = c("solid", "solid"), legend=c(0.70,0.75), break.time.by=1, xlim=c(0,32), font.x=c("bold"),
font.y=c("bold"), font.tickslab=c("bold"), yticks.by=0.1)
358
359 BilanV19C1117 <- dplyr::full_join(V19C1117_0.5,V19C1117_0.1)
360 BilanV19C1117 <- dplyr::full_join(BilanV19C1117,EcolioP50AF)
361
362 fit_BilanV19C1117 <- survfit(Surv(Temps, Statut)~Souche, data=BilanV19C1117)
363 pBilanV19C1117<-ggsurvplot(fit_BilanV19C1117, pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int = FALSE, title = "Effets de l'extrait
apolaire sur la longévité de c. elegans N2", xlab = "Temps (jours)", ylab = "Probabilité de survie", surv.median.line = 'hv',
ggtheme = theme_bw(), legend.title = "Conditions", legend.labs = c("Témoïn 2", "Extrait apolaire (0.1%)", "Extrait apolaire
(0.5%)"), palette = c("black", "orange", "blue"), linetype = c("solid", "solid", "solid"), legend=c(0.70,0.75), break.time.by=1,
xlim=c(0,27), font.x=c("bold"), font.y=c("bold"), font.tickslab=c("bold"), yticks.by=0.1)
364
365
366 BilanV19C1125 <- dplyr::full_join(EcolioP50,V19C1125_0.1)
367 BilanV19C1125 <- dplyr::full_join(BilanV19C1125,V19C1125_0.5)
368
369 fit_BilanV19C1125 <- survfit(Surv(Temps, Statut)~Souche, data=BilanV19C1125)
370 pBilanV19C1125<-ggsurvplot(fit_BilanV19C1125, pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int = FALSE, title = "Effets de V19C1125
(extrait éthanolique) sur la longévité de c. elegans N2", xlab = "Temps (jours)", ylab = "Probabilité de survie",
surv.median.line = 'hv', ggtheme = theme_bw(), legend.title = "Conditions", legend.labs = c("Témoïn 1", "c (0.1%)", "c
(0.5%)"), palette = c("black", "orange", "blue"), linetype = c("solid", "solid", "solid"), legend=c(0.80,0.75), break.time.by=1,
xlim=c(0,22), font.x=c("bold"), font.y=c("bold"), font.tickslab=c("bold"), yticks.by=0.1)
371
372 BilanV19C1127 <- dplyr::full_join(EcolioP50,V19C1127_0.5)
373 BilanV19C1127 <- dplyr::full_join(BilanV19C1127,V19C1127_1)
374 BilanV19C1127 <- dplyr::full_join(BilanV19C1127,V19C1127_2)
375
376 fit_BilanV19C1127 <- survfit(Surv(Temps, Statut)~Souche, data=BilanV19C1127)
377 pBilanV19C1127<-ggsurvplot(fit_BilanV19C1127, pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int = FALSE, title = "Effets de w40 (eau à
40°C sur fromage délipidé) sur la longévité de c. elegans N2", xlab = "Temps (jours)", ylab = "Probabilité de survie",
surv.median.line = 'hv', ggtheme = theme_bw(), legend.title = "Conditions", legend.labs = c("Témoïn 1", "w40 (0.5%)", "w40
(1%)", "w40 (2%)"), palette = c("black", "blue", "red", "purple"), linetype = c("solid", "solid", "solid", "solid"),
legend=c(0.80,0.75), break.time.by=1, xlim=c(0,23), font.x=c("bold"), font.y=c("bold"), font.tickslab=c("bold"),
yticks.by=0.1)
378
379 BilanV19C1131 <- dplyr::full_join(EcolioP50,V19C1131_0.5)
380 BilanV19C1131 <- dplyr::full_join(BilanV19C1131,V19C1131_1)
381 BilanV19C1131 <- dplyr::full_join(BilanV19C1131,V19C1131_2)
382
383 fit_BilanV19C1131 <- survfit(Surv(Temps, Statut)~Souche, data=BilanV19C1131)
384 pBilanV19C1131<-ggsurvplot(fit_BilanV19C1131, pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int = FALSE, title = "Effets de wF (Eau à
40°C de l'extraction fractionnée) sur la longévité de c. elegans N2", xlab = "Temps (jours)", ylab = "Probabilité de survie",
surv.median.line = 'hv', ggtheme = theme_bw(), legend.title = "Conditions", legend.labs = c("Témoïn 1", "wF (0.5%)", "wF
(1%)", "wF (2%)"), palette = c("black", "blue", "red", "purple"), linetype = c("solid", "solid", "solid", "solid"),
legend=c(0.80,0.75), break.time.by=1, xlim=c(0,25), font.x=c("bold"), font.y=c("bold"), font.tickslab=c("bold"),
yticks.by=0.1)
385
386 BilanV19C1133 <- dplyr::full_join(EcolioP50,V19C1133_0.5)
387 BilanV19C1133 <- dplyr::full_join(BilanV19C1133,V19C1133_1)
388 BilanV19C1133 <- dplyr::full_join(BilanV19C1133,V19C1133_2)
389
390 fit_BilanV19C1133 <- survfit(Surv(Temps, Statut)~Souche, data=BilanV19C1133)
391 pBilanV19C1133<-ggsurvplot(fit_BilanV19C1133, pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int = FALSE, title = "Effets de w70 (Eau à
70°C sur fromage délipidé) sur la longévité de c. elegans N2", xlab = "Temps (jours)", ylab = "Probabilité de survie",
surv.median.line = 'hv', ggtheme = theme_bw(), legend.title = "Conditions", legend.labs = c("Témoïn 1", "w70 (0.5%)", "w70
(1%)", "w70 (2%)"), palette = c("black", "blue", "red", "purple"), linetype = c("solid", "solid", "solid", "solid"),
legend=c(0.80,0.75), break.time.by=1, xlim=c(0,27), font.x=c("bold"), font.y=c("bold"), font.tickslab=c("bold"),
yticks.by=0.1)
392
393 BilanR18C1099 <- dplyr::full_join(EcolioP50,R18C1099_0.5)
394
395 fit_BilanR18C1099<- survfit(Surv(Temps, Statut)~Souche, data=BilanR18C1099)
396 pBilanR18C1099<-ggsurvplot(fit_BilanR18C1099, pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int = FALSE, title = "Effets du résidu de
l'extraction fractionnée sur la longévité de c. elegans N2", xlab = "Temps (jours)", ylab = "Probabilité de survie",
surv.median.line = 'hv', ggtheme = theme_bw(), legend.title = "Conditions", legend.labs = c("Témoïn 1", "Résidu (0.5%)"),
palette = c("black", "blue"), linetype = c("solid", "solid"), legend=c(0.80,0.75), break.time.by=1, xlim=c(0,22),
font.x=c("bold"), font.y=c("bold"), font.tickslab=c("bold"), yticks.by=0.1)
397
398
399 Bilanconc0.5 <- dplyr::full_join(EcolioP50,V19C1127_0.5)
400 Bilanconc0.5 <- dplyr::full_join(Bilanconc0.5,V19C1131_0.5)
401 Bilanconc0.5 <- dplyr::full_join(Bilanconc0.5,V19C1133_0.5)
402
403 fit_Bilanconc0.5<- survfit(Surv(Temps, Statut)~Souche, data=Bilanconc0.5)
404 pBilanconc0.5<-ggsurvplot(fit_Bilanconc0.5, pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int = FALSE, title = "Effets de des extraits
aqueux à 0.5 % sur la longévité de c. elegans N2", xlab = "Temps (jours)", ylab = "Probabilité de survie", surv.median.line =
'hv', ggtheme = theme_bw(), legend.title = "Conditions", legend.labs = c("Témoïn 1", "w40 (1%)", "wF (1%)", "w70 (1%)"),
palette = c("black", "blue", "red", "green"), linetype = c("solid", "solid", "solid", "solid", "solid"), legend=c(0.70,0.75),
break.time.by=1, xlim=c(0,27), font.x=c("bold"), font.y=c("bold"), font.tickslab=c("bold"), yticks.by=0.1)
405
406
407 Bilanconcl <- dplyr::full_join(EcolioP50,V19C1127_1)
408 Bilanconcl <- dplyr::full_join(Bilanconcl,V19C1131_1)
409 Bilanconcl <- dplyr::full_join(Bilanconcl,V19C1133_1)
410
411 fit_Bilanconcl<- survfit(Surv(Temps, Statut)~Souche, data=Bilanconcl)
412 pBilanconcl<-ggsurvplot(fit_Bilanconcl, pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int = FALSE, title = "Effets de des extraits aqueux
à 1 % sur la longévité de c. elegans N2", xlab = "Temps (jours)", ylab = "Probabilité de survie", surv.median.line = 'hv',
ggtheme = theme_bw(), legend.title = "Conditions", legend.labs = c("Témoïn 1", "w40 (1%)", "wF (1%)", "w70 (1%)"),
palette = c("black", "blue", "red", "green"), linetype = c("solid", "solid", "solid", "solid", "solid"), legend=c(0.70,0.75),
break.time.by=1, xlim=c(0,27), font.x=c("bold"), font.y=c("bold"), font.tickslab=c("bold"), yticks.by=0.1)

```

```
413
414
415 bilanconc2 <- dplyr::full_join(EcolioP50,V19C1127_2)
416 bilanconc2 <- dplyr::full_join(Bilanconc2,V19C1131_2)
417 bilanconc2 <- dplyr::full_join(Bilanconc2,V19C1133_2)
418
419 fit_Bilanconc2<- survfit(surv(Temps, Statut)~Souche, data=Bilanconc2)
420 pBilanconc2<-ggsurvplot(fit_Bilanconc2, pval = FALSE, pval.size = 2, conf.int = FALSE, title = "Effets de des extraits aqueux
à 2 % sur la longévité de C. elegans N2", xlab = "Temps (jours)", ylab = "Probabilité de survie", surv.median.line = 'hv',
ggtheme = theme_bw(), legend.title = "Conditions", legend.labs = c("Témoïn 1", "w40 (2%)", "wF (2%)", "w70 (2%)"), palette =
c("black", "blue", "red", "green"), linetype = c("solid", "solid", "solid", "solid", "solid"), legend=c(0.70,0.75),
break.time.by=1, xlim=c(0,27), font.x=c("bold"), font.y=c("bold"), font.tickslab=c("bold"), yticks.by=0.1)
421
422 # Impression des courbes de survie
423
424 print(pBilanL18c1084)
425 print(pBilanV19c1117)
426 print(pBilanV19c1125)
427 print(pBilanV19c1127)
428 print(pBilanV19c1131)
429 print(pBilanV19c1133)
430 print(pBilanR18c1099)
431
432 print(pBilanconc0.5)
433 print(pBilanconc1)
434 print(pBilanconc2)
435
436
437
```