



**HAL**  
open science

# Biogenèse et rôles des vésicules membranaires de *Lacticaseibacillus casei* BL23

David da Silva Barreira

► **To cite this version:**

David da Silva Barreira. Biogenèse et rôles des vésicules membranaires de *Lacticaseibacillus casei* BL23. Microbiologie et Parasitologie. Université Bourgogne Franche-Comté, 2023. Français. NNT : 2023UBFCK006 . tel-04072993

**HAL Id: tel-04072993**

**<https://theses.hal.science/tel-04072993>**

Submitted on 18 Apr 2023

**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.



## THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE

### PREPAREE A L'UNIVERSITE DE BOURGOGNE

Ecole doctorale n°554

Environnements - Santé

Doctorat en Biotechnologies Agro-Alimentaires

Spécialité Microbiologie

Par

David da Silva Barreira

Biogenèse et rôles des vésicules membranaires de la bactérie à Gram positif

*Lactocaseibacillus casei* BL23

Thèse présentée et soutenue à Dijon, le 10 février 2023

Composition du Jury :

Claire Le Henaff-Le Marrec	Professeure à l'Université Bordeaux, Bordeaux	Présidente
Yves Le-Loir	Directeur de recherche à l'INRAE, Rennes	Rapporteur
Romain Briandet	Directeur de recherche à l'INRAE, Jouy-en Josas	Rapporteur
Claire Le Henaff-Le Marrec	Professeure à l'Université Bordeaux, Bordeaux	Examinatrice
Laurent Beney	Professeur à l'Université de Bourgogne, Dijon	Examineur
Aurélié Rieu	Professeure à l'Université de Bourgogne, Dijon	Directrice de thèse
Jean Guzzo	Professeur à l'Université de Bourgogne, Dijon	Codirecteur de thèse







TABLE DES MATIERES	
REMERCIEMENTS.....	11
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES ISSUES DES TRAVAUX DE RECHERCHE .....	15
ABREVIATIONS .....	19
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	23
INTRODUCTION GENERALE .....	27
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....	31
<b>Chapitre 1 : Bactéries lactiques et lactobacilles.....</b>	<b>31</b>
<b>1. Le groupe des bactéries lactiques (LAB ; Lactic Acid Bacteria).....</b>	<b>31</b>
1.1 Taxonomie des LAB .....	31
1.2 Caractéristiques générales des LAB .....	32
1.3 Les LAB, des bactéries aux propriétés multiples.....	35
1.4 La famille des <i>Lactobacillaceae</i> .....	36
1.4.1 Évolution récente de la taxonomie des <i>Lactobacillaceae</i> .....	36
1.4.2 Caractéristiques générales des <i>Lactobacillaceae</i> .....	37
<b>2. Phages et prophages des LAB.....</b>	<b>39</b>
2.1 Les bactériophages.....	39
2.1.1 Découverte .....	39
2.1.2 Définitions et généralités.....	40
2.1.3 Classification .....	42
2.1.3.1 Classification du comité international de la taxonomie des virus (ICTV).....	42
2.1.3.2 Classification de Baltimore.....	42
2.2 Cycle de vie des bactériophages .....	43
2.2.1 Cas des phages virulents (ou lytiques).....	44
2.2.2 Cas des phages tempérés (ou lysogéniques).....	45
2.3 Le bactériophage Lambda : un phage tempéré modèle .....	46
2.3.1 Particule virale et cycle de vie .....	46
2.3.2 Régulation menant à la lyse ou la lysogénie.....	48
2.3.2.1 Organisation du génome et régulation de l'entrée en cycle lytique ou lysogénique .....	48
2.3.2.2 Facteurs influençant le « switch » moléculaire .....	52
2.3.3 Maintien et sortie de l'état lysogénique.....	53
2.4 Les phages de LAB : problèmes et opportunités.....	54
2.4.1 Les phages de LAB : des ennemis de l'industrie .....	54
2.4.2 Diversité des phages de LAB .....	54
2.4.3 Les sources de phages .....	55
2.4.4 Les stratégies d'élimination .....	55

2.4.5 Utilisations des phages de LAB .....	56
<b>3. Utilisation des propriétés probiotiques et antimicrobiennes des lactobacilles .....</b>	<b>57</b>
3.1 Rôles probiotiques des <i>Lactobacillaceae</i> .....	57
3.1.1 Les probiotiques : définition et généralités .....	57
3.1.2 Lactobacilles et modulation de la réponse immunitaire .....	61
3.1.2.1 Généralités sur le microbiote et le système immunitaire du tractus gastro-intestinal .....	61
3.1.2.2 Activités immunomodulatrices .....	65
3.1.3 Rôle antimicrobien des lactobacilles .....	67
3.2 Rôles des <i>Lactobacillaceae</i> contre les biofilms de pathogènes .....	68
3.2.1 Les biofilms bactériens .....	68
3.2.1.1 Définition .....	68
3.2.1.2 La formation des biofilms .....	69
3.2.1.3 Biofilm de <i>Salmonella enterica</i> .....	70
3.2.1.4 Les impacts des biofilms bactériens .....	71
3.2.1.5 Les modèles d'étude des biofilms .....	74
3.2.1.6 Les stratégies d'élimination des biofilms bactériens .....	76
3.2.2 Propriétés antibiofilm des lactobacilles .....	79
<b>Chapitre 2 : Vésicules membranaires des bactéries .....</b>	<b>83</b>
<b>1. Les vésicules membranaires : des structures universelles .....</b>	<b>83</b>
1.1 Que sont les vésicules membranaires ? .....	83
1.1.1 Définition .....	83
1.1.2 Diversité des MVs : taille et composition .....	87
1.2 Isolement, observation et quantification des MVs .....	89
1.2.1 Méthodes d'isolement des MVs .....	89
1.2.2 Conservation et préservation de l'intégrité des MVs .....	93
1.2.3 Méthodes d'analyse des MVs .....	96
1.2.4 Nouvelles avancées et défis techniques liés à l'étude des MVs ...	100
1.2.4.1 Approche de purification par triage en cytométrie en flux .....	100
1.2.4.2 Méthodes d'analyse de la taille et de la concentration	101
<b>2. Biogenèse des vésicules membranaires de bactéries .....</b>	<b>103</b>
2.1 Introduction sur les mécanismes de biogenèse des MVs bactériennes .....	103
2.2 Biogenèse des MVs de bactéries à Gram négatif .....	104
2.2.1 Réduction des interactions entre la membrane externe et le peptidoglycane .....	104
2.2.2 Motilité bactérienne : rôle des flagelles .....	106
2.2.3 Accumulation d'agrégats cellulaires dans le périplasme .....	106

2.2.4	Perte d'intégrité de la paroi cellulaire .....	106
2.2.5	Rôle des molécules du quorum sensing .....	107
2.2.6	Rôle de lipides membranaires .....	108
2.2.7	Contrôle génétique de la production des MVs.....	109
2.3	Biogenèse des MVs de bactéries à Gram positif.....	110
2.3.1	Pression de turgescence .....	110
2.3.2	Intégrité de la paroi cellulaire.....	110
2.3.3	Molécules impliquées dans la production de MVs.....	112
2.3.4	Composition lipidique des MVs .....	112
2.3.5	Contrôle génétique de la production des MVs.....	112
2.4	Invagination et biogenèse des MVs .....	113
2.5	Régulation de la biogenèse des MVs .....	113
2.5.1	Production constitutive .....	113
2.5.2	Impact de l'environnement sur la production de MVs.....	113
<b>3.</b>	<b>Rôles attribués aux MVs libérées par les bactéries.....</b>	<b>115</b>
3.1	Système de sécrétion et protection du contenu vésiculaire.....	115
3.2	Résistance aux stress environnementaux.....	116
3.3	Contribution des MVs au sein des communautés microbiennes.....	117
3.3.1	Contribution des MVs aux interactions bactéries/bactéries .....	117
3.3.2	Contribution des MVs aux interactions bactéries/hôtes.....	118
<b>4.</b>	<b>Relation entre les MVs et la forme de vie biofilm .....</b>	<b>119</b>
4.1	Présence de MVs dans les biofilms .....	119
4.2.	Caractéristiques des MVs de biofilms .....	120
4.3	MVs et matrice extracellulaire.....	120
4.3.1	Les MVs sont un élément structurant de la matrice extracellulaire .....	120
4.3.2	Libération d'ADN extracellulaire.....	121
4.4	Rôles des MVs dans les biofilms.....	122
4.5	Inhibition des biofilms.....	122
<b>Chapitre 3 :</b>	<b>Les vésicules membranaires de lactobacilles .....</b>	<b>125</b>
<b>1.</b>	<b>Biogenèse et caractérisation des MVs de lactobacilles .....</b>	<b>125</b>
<b>2.</b>	<b>MVs de lactobacilles et mode de vie biofilm .....</b>	<b>126</b>
<b>3.</b>	<b>Effets probiotiques des MVs de lactobacilles .....</b>	<b>127</b>
3.1	Activités antimicrobiennes.....	127
3.2	Communication avec l'hôte .....	127
3.3	Activité des vésicules sur le système immunitaire de l'hôte .....	128
<b>4.</b>	<b>Applications et autres effets notables des MVs de lactobacilles .....</b>	<b>130</b>



<b>OBJECTIFS DE LA THESE.....</b>	<b>133</b>
<b>RESULTATS .....</b>	<b>135</b>
<b>Chapitre 1 : Biogenèse et caractérisation des MVs de <i>Lacticaseibacillus casei</i> BL23 .....</b>	<b>135</b>
<b>1. Article 1 : La biogenèse des vésicules membranaires de <i>L. casei</i> BL23 .....</b>	<b>135</b>
<b>2. Travaux complémentaires .....</b>	<b>159</b>
2.1 Etude de l'excision et de la réplication du phage PLE2.....	159
2.1.1 Introduction : contexte et objectifs.....	159
2.1.2 Matériels et méthodes .....	159
2.1.3 Résultats – Discussion.....	162
2.1.4 Conclusions – perspectives.....	166
2.2 Développement d'outils de caractérisation des MVs .....	166
2.2.1 Introduction : contexte et objectifs .....	166
2.2.2 Matériels et méthodes .....	167
2.2.3 Résultats – Discussion.....	169
2.2.4 Conclusions – perspectives.....	173
<b>Chapitre 2 : Rôles des MVs de <i>Lacticaseibacillus casei</i> BL23.....</b>	<b>175</b>
<b>1. Article 2 : Rôle antibiofilm des vésicules membranaires de <i>L. casei</i> BL23 .....</b>	<b>175</b>
<b>2. Travaux complémentaires de l'article 2 .....</b>	<b>202</b>
2.1 Introduction .....	202
2.2 Matériels et méthodes.....	202
2.3 Résultats – Discussion .....	205
2.3.1 Purification de l'hydrolase du peptidoglycane (LCABL_00230) et activité antibiofilm.....	205
2.3.2 Caractérisation des mutants.....	207
2.4 Conclusions – perspectives .....	210
<b>3. Activité immumodulatrices des vésicules membranaires de <i>L. casei</i> BL23 .....</b>	<b>210</b>
3.1 Introduction .....	210
3.2 Matériels et méthodes.....	210
3.3 Résultats – Discussion .....	211
3.4. Conclusions – perspectives .....	213
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>217</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>223</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>261</b>





## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mes directeurs de thèse, le Dr Aurélie Rieu et le Pr Jean Guzzo de m'avoir accordé leur confiance pour mener à bien ce projet de thèse. Je les remercie pour leur investissement et les conseils qu'ils ont pu me donner tout au long de ces années. Je remercie Aurélie pour les nombreuses discussions et son soutien constant.

Je souhaite également remercier l'Université de Bourgogne, l'UMR PAM et l'équipe VALMiS de m'avoir accueilli dans leurs locaux et d'avoir mis à disposition le matériel de recherche avec lequel j'ai pu réaliser ces travaux. De même, je remercie l'ISITE UBFC pour avoir participé au financement de ma thèse et le conseil régional de Bourgogne Franche-Comté ainsi que le FEDER pour avoir financé mes travaux de recherche. Je souhaite également remercier SAYENS pour leur investissement et les financements qui ont permis le dépôt d'une demande de brevet.

Merci à toutes les personnes ayant participé directement à ce travail de recherche. Notamment, je remercie Julie Laurent pour la relecture de ce manuscrit et son investissement dans ma thèse. Merci pour les nombreuses discussions et le soutien. Je remercie Jessica Lourenço pour son travail et le Dr Pierre Lapaquette pour avoir partagé ses conseils et son expertise.

Je remercie également les différentes plateformes que nous avons sollicitées pour nos travaux. Je tiens à souligner le travail exceptionnel réalisé par la plateforme d'imagerie cellulaire DImaCell. Je remercie le Dr Jeanine Lherminier, le Dr Laure Avoscan, Aline Bonnotte, Véronique Aubert, Élodie Noirot, Christine Arnould pour leur temps et leur expertise. J'ajouterais que j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler à leurs côtés.

Je remercie le Dr Yohann Coute et Julia Novion Ducassou de la plateforme de protéomique EDyP ainsi que le Dr Pauline Maes et Franck Hyvrier de la plateforme CLIPP (Clinical Innovation Proteomic Platform) pour leur travail de grande qualité.

Merci au Dr Stéphanie Weidmann pour ses conseils et sa confiance.

Je souhaite remercier les doctorants et les anciens doctorants avec lesquels j'ai pu travailler et grâce auxquels j'ai beaucoup appris. Merci au Dr Arnaud Heumann, au Dr Elissar Al Tarraf et à Tiffany Bellanger.

De même, je remercie les stagiaires qui ont travaillé à mes côtés : Amaury Aumeunier et Alexis Gorce.

Je tenais à mentionner des personnes qui ont eu un rôle particulièrement important au cours de ma scolarité.

Merci à Mme Kubicki (Institutrice ; Ecole Primaire Jean Jaurès - Malakoff ; CE2 - 2002) de m'avoir offert la chance de pouvoir doubler mon année de CE2.

Merci à Mme Huguet (Institutrice ; Ecole Primaire Jean Jaurès - Malakoff ; CM2 - 2005) de m'avoir redonné confiance.

Merci à Mme Tassou (Professeure de Français ; Collège Notre Dame de France - Malakoff ; 3ème - 2009) et à Mme Lavedrine (Professeure d'Espagnol ; Collège Notre Dame de France - Malakoff ; 4ème - 2008 et 3ème - 2009). Deux héroïnes.

Merci à Mme Arnaud (Professeure de Mathématiques ; Ecole Normale Catholique - Paris 15<sup>e</sup> ; Terminale Scientifique - 2013). Merci pour votre patience et votre confiance.

Mme Salome (Professeure de Sciences et Vie de la Terre ; Ecole Normale Catholique - Paris 15<sup>e</sup> ; Terminale Scientifique - 2013). C'est un peu de votre faute si j'ai fait de la biologie.

De même, je souhaite mentionner des enseignants extraordinaires que j'ai croisés lors de mon cursus universitaire. Je remercie leur investissement et je voulais rendre hommage à la qualité des enseignements auxquels j'ai eu la chance de participer. Ils m'ont rendu la tâche agréable et ont indirectement contribué à ce travail.

Merci au Pr Guennadi Sezonov (UPMC ; Génétique Bactérienne et Régulations Cellulaires UE 3V523 et Bactériologie Moléculaire et Médicale UE 4V139).

Merci au Pr Julien Fellah UPMC (UPMC ; Immunologie Générale UE LV341 et Immunologie Fondamentale et Intégrée UE 4V123).

Merci au Pr Pierre Sarthou (UPMC ; Biochimie-Métabolisme UE 2V313 et Enzymologie UE 3V513).

Merci au Pr Dominique Boucher (UPMC ; Régulation des Gènes Bactériens UE 3V526).

Merci au Pr Emmanuèle Mouchel-Vielh (UPMC ; Génétique UE 2V311 et Génétique et Biologie Moléculaire UE 3V611).

Merci au Dr Dominique Lamy (UPMC ; Stats de Bronze UE 4V333 et Statistiques et mathématiques pour la biologie UE 3V614).

Merci au Pr Thierry Soussi (UPMC ; Génétique et Biologie Moléculaire UE 3V611).

Merci au Dr Nathalie Jourdan (UPMC ; Virologie UE 4V145).

Je voulais également remercier mes encadrants de stages pour leur confiance et la qualité de leurs enseignements.

Merci au Dr Patrice Meimoun (Maitre de Conférences à l'Université Pierre et Marie Curie ; Équipe : Biologie des Semences) pour sa confiance et son encadrement de qualité.

Merci au Dr Monica Rolando (Chercheuse à l'institut Pasteur ; Équipe : Biologie des Bactéries Intracellulaires). J'ai beaucoup appris à vos côtés.

Merci au Dr Eliette Touati (Chef de groupe ; Groupe : Infection, Genotoxicite et Cancer). Merci pour votre temps et votre expertise. J'ai beaucoup appris et apprécié de travailler à vos côtés.

Je remercie les membres de mon comité de suivi de thèse, Éric Guédon, Michel Hebraud, Carmen Garrido pour leur expertise et leurs conseils.

Enfin, je souhaite remercier les membres du jury, Yves Le-Loir, Romain Briandet, Claire Le Henaff-Le Marrec et Laurent Beney d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse.





## PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES ISSUES DES TRAVAUX DE RECHERCHE

- **Publications scientifiques**

Ce travail de thèse a fait l'objet de 2 articles scientifiques publiés ou soumis dans des revues scientifiques à comité de lecture.

Titre : « Spontaneous Prophage Induction Contributes to the Production of Membrane Vesicles by the Gram-Positive Bacterium *Lactocaseibacillus casei* BL23 ».

David da Silva Barreira, Pierre Lapaquette, Julia Novion Ducassou, Yohann Couté, Jean Guzzo, Aurélie Rieu

(mBio, 2022; DOI 10.1128/mbio.02375-22)

Titre : « Membrane vesicles released by *Lactocaseibacillus casei* BL23 inhibit the biofilm formation of *Salmonella Enteritidis* ».

David da Silva Barreira, Julie Laurent, Jessica Lourenço, Julia Novion Ducassou, Yohann Couté, Jean Guzzo and Aurélie Rieu

En révision dans le Journal Scientific Report

Dans le cadre de ma thèse, j'ai participé aux travaux de thèse d'Arnaud Heumann, d'Elissar Al Tarraf et de Tiffany Bellanger.

Titre : « Intestinal release of biofilm-like microcolonies encased in calcium-pectinate beads increases probiotic properties of *Lactocaseibacillus paracasei* ATCC334 ».

Arnaud Heumann, Ali Assifaoui, David da Silva Barreira, Charles Thomas, Romain Briandet, Julie Laurent, Laurent Beney, Pierre Lapaquette, Jean Guzzo, Aurélie Rieu

(npj Biofilms and Microbiomes, 2020; DOI 10.1038/s41522-020-00159-3)

J'ai participé aux expérimentations (dosage des cytokines par multiplexage) et à l'analyse d'images de microscopie (colorisation des images de MEB, quantification des foci des images obtenues en microscopie confocale)

Titre : « Resveratrol Favors Adhesion and Biofilm Formation of *Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* Strain ATCC334 ».

Jana Al Azzaz, Elissar Al Tarraf, Arnaud Heumann, David da Silva Barreira, Julie Laurent, Ali Assifaoui, Aurélie Rieu, Jean Guzzo, Pierre Lapaquette

(International Journal of Molecular Sciences, 2020 ; DOI 10.3390/ijms21155423)

J'ai participé aux expérimentations de dosage de cytokines par ELISA.

Les travaux de mon Master de recherche menés sous la direction du docteur Eliette Touati dans l'unité de « Pathogénèse de *Helicobacter* » de l'Institut Pasteur ont été intégrés à une publication scientifique en 2019.

Titre : « USF1 defect drives p53 degradation during *Helicobacter pylori* infection and accelerates gastric carcinogenesis ».

Lionel Costa, Sébastien Corre, Valérie Michel, Krysten Le Luel, Julien Fernandes, Jason Ziveri, Gregory Jouvion, Anne Danckaert, Nicolas Mouchet, David Da Silva Barreira, Javier Torres, Margarita



Camorlinga, Mario Milco D'Elios, Laurence Fiette, Hilde De Reuse, Marie-Dominique Galibert, Elette Touati

(Gut, 2019; DOI 10.1136/gutjnl-2019-318640)

J'ai participé aux expérimentations de microscopie et d'immunoempreintes.

- **Brevet**

Une partie des travaux de ma thèse font actuellement l'objet d'une demande de brevet international intitulée « Utilisation anti-biofilm de vésicules membranaires extracellulaires », numéro PCT/FR2021/052374 (cf. Annexe).

- **Communications orales**

J'ai eu l'opportunité de présenter nos travaux à l'occasion de 2 communications orales dans le cadre du congrès de la SFM 2022 et des JDD 2019 organisées par l'UMR PAM de Dijon.

### **Congrès SFM 2022 | Société Française de Microbiologie 2022**

Titre : « Utilisation de vésicules membranaires produites par *Lacticaseibacillus casei* pour prévenir la formation de biofilms de *Salmonella* Enteritidis ».

David da Silva Barreira, Julie Laurent, Jessica Lourenço, Jean Guzzo, Aurélie Rieu

### **JDD 2019 | Journée des doctorants de l'UMR PAM (2019)**

Titre : « Mise au point d'une méthode de purification de vésicules extracellulaires ».

David da Silva Barreira, Annie Frelet Barrand, Carmen Garrido, Jean Guzzo, Aurélie Rieu

- **Posters**

J'ai présenté nos travaux sous forme de communications affichées dans le cadre de congrès nationaux et internationaux :

### **Congrès SFM 2022 | Société Française de Microbiologie 2022**

Titre : « Characterization of the prophage-triggered production of membrane vesicles by the Gram-positive bacterium *Lacticaseibacillus casei* BL23 ».

David da Silva Barreira, Pierre Lapaquette, Jean Guzzo, Aurélie Rieu

### **Congrès SFM 2022 | Société Française de Microbiologie 2022**

Titre : « Lien entre la structure tertiaire de la protéine de stress Lo18 et son rôle de lipochaperon moléculaire ».

Tiffany Bellanger, Sophie Combet, Paloma Fernandez-Varela, David da Silva Barreira, Fabrice Neiers, Aurélie Rieu, Stéphanie Weidmann

### **Congrès VOM 2022 | Viruses of Microbes 2022**

Titre : « Contribution of prophages in extracellular vesicle production by the Gram-positive bacterium *Lacticaseibacillus casei* BL23 ».

David da Silva Barreira, Pierre Lapaquette, Jean Guzzo, Aurélie Rieu

### **Congrès EMBO EMBL | New Approaches and Concepts in Microbiology (EMBL Heidelberg, Germany july 2019)**

Titre : « Attenuation of dextran sulphate sodium-induced colitis in mice by *Lactobacillus paracasei* biofilm ».

David da Silva Barreira and Arnaud Heumann, Ali Assifaoui, Charles Thomas, Romain Briandet, Julie Laurent, Stéphanie Weidmann, Pierre Lapaquette, Jean Guzzo, Aurélie Rieu

**FJC 2019 | Forum des Jeunes Chercheurs 2019 (Obtention du prix du meilleur du poster)**

Titre : « Attenuation of dextran sulphate sodium-induced colitis in mice by *Lactobacillus paracasei* biofilm ».

Arnaud Heumann, David da Silva Barreira, Ali Assifaoui, Charles Thomas, Romain Briandet, Julie Laurent, Stéphanie Weidmann, Pierre Lapaquette, Jean Guzzo, Aurélie Rieu



## ABREVIATIONS

### A

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ADNe : ADN extracellulaire

ADNg : ADN génomique

AFM : Microscope à force atomique (EN : "Atomic Force Microscopy")

AHLs : N-acyl homosérine lactones

AMP : Protéine antimicrobienne

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ATB : Antibiotique

### B

bp : Paire de bases (EN : "base pair")

### C

CD : Centrifugation différentielle

CES : Chromatographie d'exclusion stérique

CMVs : Vésicules de la membrane cytoplasmique (EN : "Cytoplasmic Membrane Vesicles")

### D

DCS : Sédimentation centrifuge différentielle (EN : "Differential Centrifugal Sedimentation")

DLS : Diffusion dynamique de la lumière (EN : "Dynamic Light Scattering")

DNase : Désoxyribonucléase

### E

EDTA : Acide éthylène diamine tétra acétique

ELISA : Dosage immuno-enzymatique sur support solide (EN : "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay")

EOMVs : Vésicules explosives de la membrane externe (EN : "Explosive Outer- Membrane Vesicles")

EPS : Substances polymériques extracellulaires (EN : "Extracellular Polymeric Substances ")

EVs : Vésicules extracellulaires (EN : "Extracellular Vesicles")

### F

FCM : Cytométrie en flux (EN : "Flow CytoMetry")

### G

GD : Gradient de densité

GFP : Protéine fluorescente verte (EN : "Green Fluorescent Protein")

### I

IA : Isolement par affinité

ICTV : Comité international de la taxonomie des virus (EN : "International Committee on Taxonomy of Viruses")

Ig : Immunoglobuline

IgA : Immunoglobuline A

IgG : Immunoglobuline G

## **K**

kDa : Kilodalton

## **L**

LAB : Bactéries lactiques (EN : "Lactic Acid Bacteria")

LB : Milieu de culture Luria-Bertani

LC-MVs : Vésicules membranaires de *L. casei* BL23

LP-MVs : Vésicules membranaires de *L. plantarum* WCFS-1

Lpp : lipoprotéines de Braun

LPS : Lipopolysaccharide

LTA : Acide lipotéichoïque (EN : "Lipoteichoic Acids")

## **M**

MDSL : DLS multi-angle (EN : "Multi-angle DLS")

MEB : Microscope électronique à balayage

MET : Microscope électronique à transmission

MRS : Milieu de culture Man-Rogosa-Sharpe

MVs : Vésicules membranaires (EN : "Membrane Vesicles")

## **N**

nFCM : Nano-cytométrie en flux (EN : "nano Flow CytoMetry")

NTA : Analyse du suivi individuel de nanoparticules (EN : "Nanoparticle Tracking Analysis")

## **O**

OIMVs : Vésicules de la membrane externe et interne (EN : "Outer- Inner Membrane Vesicles")

OMS : Organisation mondiale de la sante

OMVs : Vésicules de la membrane externe (EN : "Outer Membrane Vesicles")

## **P**

PAMPs : Motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (EN : "Pathogen Associated Molecular Patterns")

PBMC : cellules mononuclées du sang périphérique (EN : "Peripheral Blood Mononuclear Cells")

PBS : Tampon phosphate salin (EN : "phosphate-buffered saline")

PG : Peptidoglycane

PGH : Hydrolase du peptidoglycane (EN : "Peptidoglycan Hydrolase")

pH : Potentiel hydrogène

PP : Précipitation

PQS : (EN : "Pseudomonas Quinolones Signal")

PRRs : Récepteurs de reconnaissance des PAMPs (EN : "Pattern Recognition Receptors")

PSA : Polysaccharide A

PSMs : Modulines solubles dans le phénol (EN : "Phenol-Soluble Modulins")

## **Q**

QS : quorum sensing

## **R**

ROS : Espèces réactives de l'oxygène (EN : "Reactive Oxygen Species")

## **T**

TA : Acide téichoïque (EN : "Teichoic Acid")

TGI : tractus gastro-intestinal

THG : Transferts horizontaux de gènes

TLR : Toll-Like Receptor

TNF- $\alpha$  : Facteurs de nécrose tumorale (EN : "Tumor Necrosis Factors")

Treg : Lymphocyte T régulateur

TRPS : Détection d'impulsion résistive ajustable (EN : "Tunable Resistive Pulse Sensing")

## **U**

UF : Ultrafiltration

UV : rayonnement ultraviolet

## **W**

WB : Immunoempreinte (EN : "Western blot")



## LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

### Liste des figures

- Fig. 1 Arbre phylogénétique des principaux phyla du domaine des *Bacteria* établi sur la base de comparaison de l'ARN ribosomale 16S.
- Fig. 2 Schéma simplifié des voies de fermentation du glucose par les LAB.
- Fig. 3 Arbre phylogénétique révisé de la famille des *Lactobacillaceae*.
- Fig. 4 Nombre d'espèces de lactobacilles identifiées dans diverses niches écologiques.
- Fig. 5 Félix d'Hérelle (1873-1949) dans son laboratoire rue Olivier de Serres.
- Fig. 6 Classification des bactériophages.
- Fig. 7 Particule virale du phage  $\lambda$ .
- Fig. 8 Schéma des sept classes de virus définies par la classification de Baltimore.
- Fig. 9 Cycle de vie des phages tempérés.
- Fig. 10 Cycles de vie du phage  $\lambda$ .
- Fig. 11 Intégration et excision de l'ADN phagique.
- Fig. 12 Carte génétique et unités transcriptionnelles de la région régulatrice du phage  $\lambda$ .
- Fig. 13 Schéma des régulations génétiques du phage  $\lambda$  conduisant à la voie lytique et lysogénique.
- Fig. 14 Régulation du passage de la voie lysogénique à la voie lytique.
- Fig. 15 Elie Metchnikoff (1845-1916) dans son laboratoire à l'Institut Pasteur.
- Fig. 16 Principaux mécanismes d'action des probiotiques.
- Fig. 17 Le microbiote humain.
- Fig. 18 Anatomie du système immunitaire intestinal.
- Fig. 19 Modulation des voies de signalisation inflammatoires de macrophages par les lactobacilles.
- Fig. 20 Schéma illustrant les 5 étapes clés de la formation d'un biofilm bactérien.
- Fig. 21 Exemples d'infections chez l'Homme liées à la formation de biofilms de pathogènes.
- Fig. 22 Utilisation de cellules probiotiques pour lutter contre les biofilms de pathogènes.
- Fig. 23 Type de vésicules membranaires libérées par les bactéries à Gram négatif et principaux mécanismes de production.
- Fig. 24 Type de vésicules membranaires libérées par les bactéries à Gram positif et principaux mécanismes de production.
- Fig. 25 Types de vésicules membranaires libérées par les cellules eucaryotes selon l'origine des cellules et la voie de biogenèse empruntée.
- Fig. 26 Représentation schématique de la composition des vésicules membranaires produites par les bactéries à Gram négatif et les bactéries à Gram positif.
- Fig. 27 Structure chimique des principaux phospholipides présents dans les membranes bactériennes.
- Fig. 28 Graphique taille/densité des vésicules membranaires bactériennes et des nanoparticules fréquemment présentes dans les selles, le sang et le plasma.
- Fig. 29 Illustration schématique des méthodes les plus couramment utilisées pour isoler les vésicules membranaires.
- Fig. 30 Analyse par cytométrie en flux de la proportion de particules fluorescentes dans une fraction vésiculaire de *Staphylococcus aureus* obtenue par ultracentrifugation sur gradient de densité.
- Fig. 31 Comparaison de la performance des appareils communément utilisés pour mesurer la quantité et la distribution de nanoparticules.
- Fig. 32 Mécanismes de biogenèse des vésicules membranaires de bactéries à Gram négatif.
- Fig. 33 Mécanisme de biogenèse des vésicules membranaires de bactéries à Gram négatif.



Fig. 34 Evolution du nombre d'articles de recherche publiés sur les vésicules membranaires de lactobacilles.

Fig. 35 Cartes génétique du prophage PLE2.

Fig. 36 Illustration du rôle joué par les ADN primases et les ADN hélicases lors de l'initiation et de la synthèse de l'ADN au cours de la réplication.

Fig. 37 Identification par RT-PCR des limites de l'opéron contenant le gène codant pour la DNA primase (LCABL\_RS05400).

Fig. 38 Effet de la mutation de plusieurs gènes de PLE2 sur sa réplication dans *L. casei* BL23.

Fig. 39 Prédiction de la solubilité et de la présence de peptides signaux dans les protéines des fractions vésiculaires de *L. casei* BL23.

Fig. 40 Prédiction de la topologie transmembranaire de la protéine YhgE (LCABL\_RS00820) avec le logiciel Phobius.

Fig. 41 Vérification par Immunoempreinte (ou Western blot) de la spécificité des anticorps SE0149 dirigés contre YhgE.

Fig. 42 Vérification par Immunoempreinte (ou Western blot) de la spécificité des anticorps SE0099 dirigés contre GroEL.

Fig. 43 Vérification par Immunoempreinte (ou Western blot) de la présence de la protéine LCABL\_00230 au cours des étapes de purification par Agarose Ni-NTA.

Fig. 44 Effets de la protéine LCABL\_00230 sur la formation de biofilm par *S. Enteritidis*.

Fig. 45 Effets de la mutation des gènes codant pour les protéines les plus abondantes de la fraction vésiculaire de *L. casei* BL23 sur la croissance, la formation du biofilm et la morphologie des bactéries.

Fig. 46 Comparaison des profils protéiques des MVs des souches mutantes et de la souche parentale de *L. casei* par SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie.

Fig. 47 Effet des MVs de *L. casei* BL23 sur la sécrétion de TNF- $\alpha$  par des macrophages dérivés de monocytes (THP-1) stimulés au LPS.

### Liste des tableaux

Tableau 1 Rang taxonomique d'une bactérie lactique ; la souche *Lacticaseibacillus casei* BL23.

Tableau 2 Caractéristiques permettant l'identification de la famille et du genre des LAB.

Tableau 3 Voie de fermentation du glucose d'espèces importantes de la famille des *Lactobacillaceae*.

Tableau 4 Principaux microorganismes utilisés pour leurs activités probiotiques.

Tableau 5 Principales bactéries pathogènes responsables d'infections alimentaires.

Tableau 6 Stratégies de lutte contre la formation des biofilms négatifs.

Tableau 7 Comparaison des méthodes les plus couramment utilisées pour isoler les vésicules membranaires.

Tableau 8 Comparaison des méthodes les plus couramment utilisées pour analyser les propriétés physiques des vésicules membranaires.

Tableau 9 Souches (A), plasmides (B) et oligonucléotides (C) utilisés dans cette étude.

Tableau 10 Souches (A), plasmides (B) et oligonucléotides (C) utilisés dans cette étude.

Tableau 11 Souches (A), plasmides (B) et oligonucléotides (C) utilisés dans cette étude.





## INTRODUCTION GENERALE

Les lactobacilles sont des bactéries à Gram positif très diversifiées regroupant des bactéries du microbiote intestinal ainsi que des bactéries utilisées dans les procédés industriels de fermentation. En particulier, les membres de l'espèce des *Lacticaseibacillus casei* sont très utilisés dans l'industrie agroalimentaire comme ferment lactique. Certaines souches présentent également des activités probiotiques bénéfiques pour l'Homme et on estime que leur consommation génère près de 6 milliards de dollars chaque année (Cai *et al.*, 2009). Ces bactéries sont présentes dans une multitude d'habitats et ont pu être isolées de divers produits alimentaires (ex. produits laitiers, cornichons, ensilage d'avoine) ainsi que des voies reproductives et gastro-intestinales de mammifères (Zheng *et al.*, 2020; Cai *et al.*, 2009; Wuyts *et al.*, 2017). L'espèce *Lacticaseibacillus casei* regroupe des bactéries non mobiles, hétérofermentaires facultatives, oxydase négatif et mésophiles. De plus, elle est la seule espèce de lactobacille présentant des membres catalase positif (Zheng *et al.*, 2020; Wuyts *et al.*, 2017). Comme tous les organismes vivants, les lactobacilles produisent des vésicules membranaires (MVs) qui sont des nanostructures de 20 à 400 nm de diamètre délimitées par une membrane lipidique. Ces vésicules peuvent contenir divers constituants cellulaires et sont reconnues pour exercer de multiples fonctions. L'étude des MVs est une thématique qui depuis les 10 dernières années jouit d'un fort intérêt en raison de la pluralité des fonctions attribuées à ces structures. La recherche sur les MVs s'est principalement concentrée sur les bactéries à Gram négatif et malgré l'intérêt croissant accordé aux MVs de bactéries à Gram positif, les mécanismes de biogenèse et les rôles exercés par ces vésicules restent encore à élucider. En particulier, les mécanismes de biogenèse des bactéries du genre *Lacticaseibacillus* restent largement méconnus et bien qu'un certain nombre de rôles aient été identifiés, leur diversité rend difficiles les généralisations et plaide pour la diversification des modèles d'étude.

C'est pourquoi, dans le cadre de ma thèse, nous nous sommes intéressés à la bactérie du lait *Lacticaseibacillus casei* BL23 qui est connue pour ces activités probiotiques. Notamment, il a été montré que *L. casei* BL23 présente des effets anti-inflammatoires sur des modèles cellulaires *in vitro* et sur des modèles murins (Foligne *et al.*, 2007; Rochat *et al.*, 2007). De plus, plusieurs travaux ont montré qu'elle permet de prévenir des colites induites chez la souris (Watterlot *et al.*, 2010; Foligne *et al.*, 2007) et qu'elle participe à la défense de l'hôte contre les agents pathogènes (Archambaud *et al.*, 2012; C. Qin *et al.*, 2017). Enfin, *L. casei* BL23 présente également l'avantage d'être séquencée et d'être génétiquement modifiable par des approches de biologie moléculaire classiques (Mazé *et al.*, 2010, p. 23; Muñoz-Provencio *et al.*, 2012). Pour la première fois Rubio *et al.*, montrent en 2017 que *L. casei* BL23 libère des vésicules membranaires et proposent les premiers éléments de caractérisation physico-chimique de ces vésicules (Domínguez Rubio *et al.*, 2017). Cependant, les mécanismes de biogenèse des MVs restent encore à élucider et seul un léger effet immunomodulateur a pu être associé à ces vésicules (Bäuerl *et al.*, 2020).

Dans ce contexte, ma thèse a pour objet l'étude de la biogenèse et du rôle des vésicules de la bactérie à Gram positif *Lacticaseibacillus casei* BL23.

La première partie de ce manuscrit est consacrée à l'étude bibliographique des différents thèmes abordés dans ce travail de thèse. Il permet notamment d'introduire les concepts clés nécessaires à la compréhension du sujet et fait également un état des connaissances sur les vésicules membranaires libérées par les bactéries.

Les résultats obtenus au cours de cette thèse sont ensuite présentés sous forme d'articles scientifiques publiés ou soumis dans des revues scientifiques à comité de lecture. Des travaux complémentaires non publiés sont également présentés sous forme d'articles.

Enfin, une partie conclusions et perspectives clôture ce travail.

Le premier chapitre d'introduction a pour objectif de présenter les bactéries lactiques et les notions importantes abordées dans la partie résultats. Dans un premier temps, nous présenterons le groupe des bactéries lactiques et en particulier la famille des *Lactobacillaceae*. Ensuite, nous définirons ce que sont les phages et les prophages, et nous détaillerons certains de leurs mécanismes de régulation au sein des bactéries. Puis, l'utilisation des propriétés probiotiques et antimicrobiennes de certains lactobacilles sera traitée. Enfin, nous définirons le concept de biofilm et nous présenterons les rôles joués par les *Lactobacillaceae* contre les biofilms bactériens.

Le deuxième chapitre a pour objectif de faire un état des connaissances sur les vésicules membranaires de bactéries. La première partie permet de définir les vésicules membranaires et de présenter les méthodes d'isolement et d'analyse couramment utilisées. Ensuite, nous détaillerons les mécanismes de biogenèse mis en jeu dans la production de vésicules par les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Puis, un aperçu de la diversité du rôle joué par les vésicules bactériennes sera présenté. Enfin, nous présenterons l'état des connaissances sur les relations entre le mode de vie biofilm et les MVs.

Le dernier chapitre de l'introduction a quant à lui pour objectif d'exposer les connaissances actuelles sur les vésicules membranaires de lactobacilles.

La partie résultats se divise en deux chapitres. Le premier chapitre aborde la biogenèse et la caractérisation des MVs de *L. casei* BL23 et le deuxième chapitre a pour objectif l'étude des rôles joués par les MVs de cette bactérie.





## INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

### Chapitre 1 : Bactéries lactiques et lactobacilles

#### 1. Le groupe des bactéries lactiques (LAB ; Lactic Acid Bacteria)

##### 1.1 Taxonomie des LAB

Le groupe des bactéries lactiques (LAB ; Lactic Acid Bacteria) rassemble diverses bactéries sur la base de leurs capacités métaboliques. Toutes les LAB produisent de l'acide lactique comme principal produit de fermentation des hexoses. Par ailleurs, elles sont également capables de fermenter d'autres carbohydrates en acide lactique tels que des pentoses et des disaccharides (Mozzi, 2016).

Les LAB appartiennent à l'ordre des *Lactobacillales* avec des représentants dans chacune des 5 familles de ce taxon (*Lactobacillaceae*, *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae* et *Streptococcaceae*) (Tableau 1) (Makarova *et al.*, 2006; Vaughan *et al.*, 2005).

Tableau 1 Rang taxonomique d'une bactérie lactique ; la souche *Lacticaseibacillus casei* BL23.

Rang taxonomique	Organisme
Domaine	<i>Bacteria</i>
Règne	<i>Terrabacteria group</i>
Phylum	<i>Firmicutes</i>
Classe	<i>Bacilli</i>
Ordre	<i>Lactobacillales</i>
Famille	<i>Lactobacillaceae</i>
Genre	<i>Lacticaseibacillus</i>
Espèce	<i>Lacticaseibacillus casei</i>
Souche	<i>Lacticaseibacillus casei</i> BL23

Toutefois, certains auteurs considèrent que les bactéries du genre *Bifidobacterium* et *Atopobium*, membres du phylum des *Actinobacteria*, appartiennent également au groupe des LAB en raison de caractères partagés, notamment de leurs capacités fermentaires (Makarova and Koonin, 2007; Narvhus and Axelsson, 2003). Dans ce cas de figure, le regroupement des LAB sur la base de leurs capacités fermentaires ne constitue pas un critère de classification valide d'un point de vue phylogénétique, étant donné qu'elles ne forment alors pas un groupe monophylétique (Fig. 1) (Makarova and Koonin, 2007). Un groupe monophylétique est un groupe qui comprend un ancêtre hypothétique et l'ensemble de ses descendants. Dans ce travail de thèse, les bactéries lactiques sont définies comme les bactéries de l'ordre des *Lactobacillales*, capables de fermenter les hexoses en acide lactique comme principal produit de fermentation ("Lactic Acid Bacteria," 2022).



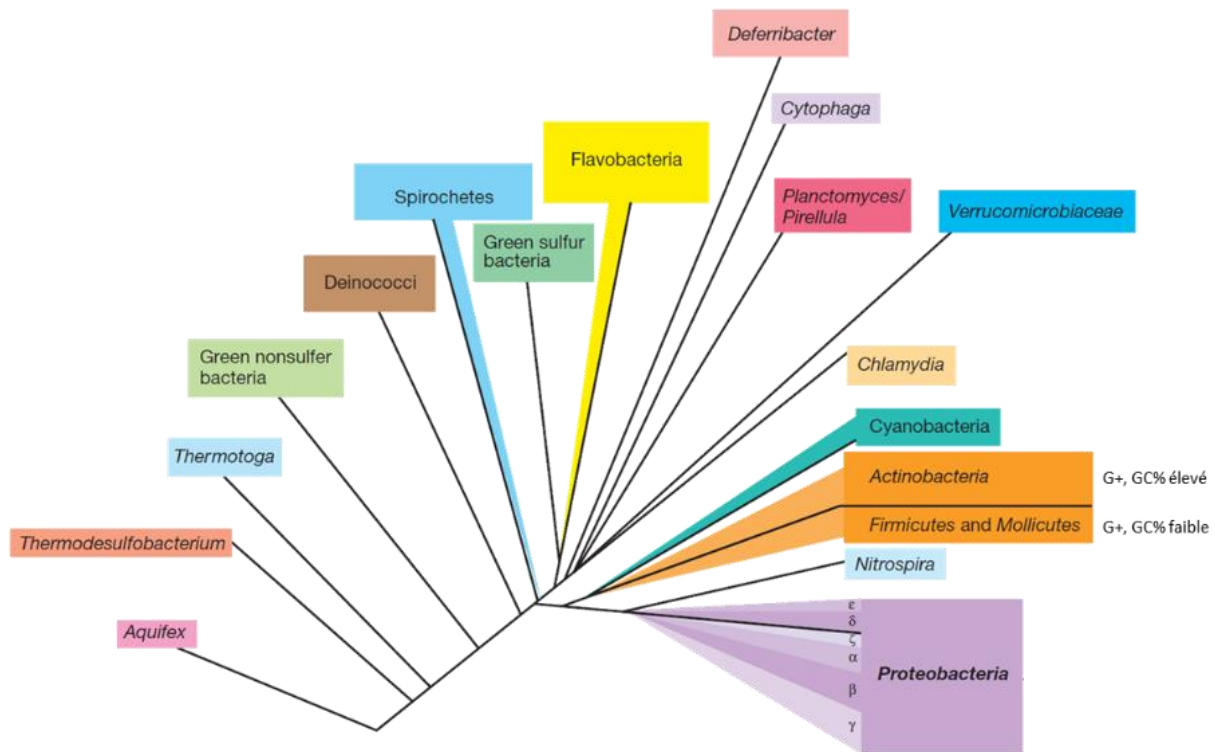


Fig. 1 Arbre phylogénétique des principaux phyla du domaine des *Bacteria* établi sur la base de comparaison de l'ARN ribosomale 16S. Notons qu'à ce jour les relations de parentés entre les phyla des *Bacteria* ne sont pas encore bien résolues, notamment en raison des nombreux événements de transferts de matériel génétiques. G+ : Bactérie à Gram positif ; Faible GC% et Fort GC% bactéries dont le génome est constitué d'un pourcentage en guanine et cytosine faible ou élevé, respectivement. Les bactéries de l'ordre des *Lactobacillales* appartient au phylum des *Firmicutes* et les bactéries des genres *Bifidobacterium* et *Atopobium* sont membres du phylum des *Actinobacteria*. Adaptée de « *Biology of Microorganisms* » 13<sup>e</sup> Edition.

### 1.2 Caractéristiques générales des LAB

Les LAB sont des bactéries à Gram positif, non mobiles, non sporulantes, catalase négatives, d'une morphologie de type coque ou bacille, ne possédant pas de système respiratoire fonctionnel. Ainsi, on trouve parmi les LAB des bactéries aérotolérantes, microaérophiles et aéroanaérobies facultatives (Mozzi, 2016). Pour subvenir à leurs besoins énergétiques, les LAB synthétisent de l'ATP et régénèrent leur stock de NAD<sup>+</sup> principalement par fermentation. La voie métabolique de fermentation utilisée est influencée par l'environnement et dépend de la présence ou de l'absence d'enzymes clés du métabolisme.

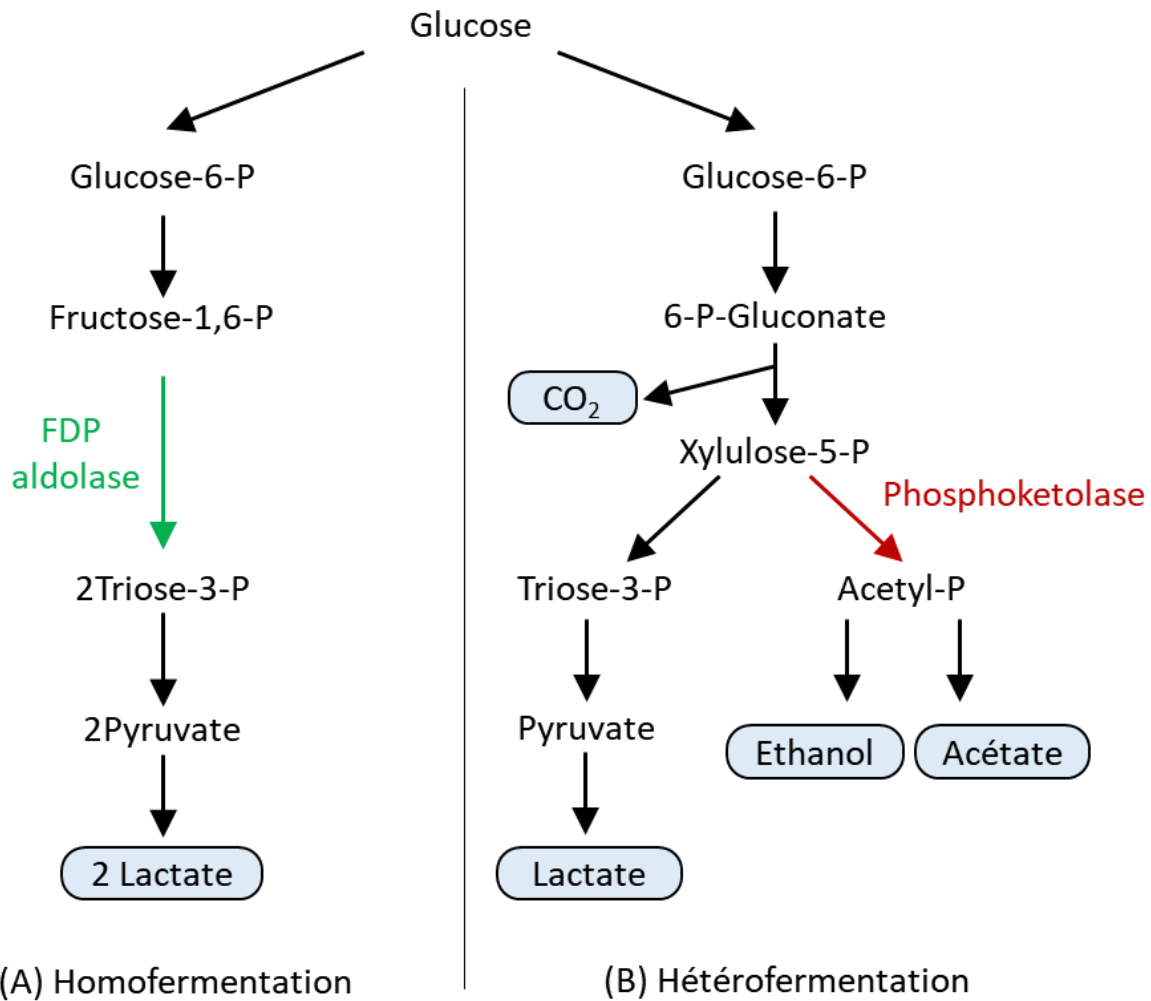


Fig. 2 Schéma simplifié des voies de fermentation du glucose par les LAB. (A) La fermentation homolactique par la glycolyse (ou voie Embden-Meyerhof) produit 2 molécules d'acide lactique par glucose métabolisé. (B) La fermentation hétérolactique du glucose par la voie des phosphokétolases pentoses (ou voie 6-phosphogluconate) produit du lactate et des quantités importantes de CO<sub>2</sub>, d'éthanol ou d'acétate. FDP aldolase : fructose 1,6 -diphosphate aldolase. Adaptée de Liu *et al.*, 2003 et « Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects » 4<sup>e</sup> édition.

Les LAB utilisent préférentiellement le glucose et le métabolise par fermentation homolactique *via* la glycolyse (ou voie Embden-Meyerhof) produisant 2 molécules de lactate par glucose (Fig. 2A). La fermentation dite hétérolactique permet quant à elle le métabolisme du glucose par la voie des phosphokétolases pentoses (ou voie 6-phosphogluconate) produisant de l'acide lactique ainsi que du CO<sub>2</sub>, de l'éthanol ou de l'acétate (Fig. 2B). Les caractéristiques permettant de distinguer le genre et la famille des LAB sont présentées dans le Tableau 2.

Tableau 2 Caractéristiques permettant l'identification de la famille et du genre des LAB. Les *Bifidobacterium* et *Atopobium* ne sont pas présentés. Adaptée de « Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects » 4<sup>e</sup> édition.

Famille	Genre	Caractéristiques								
		Morphologie	Production CO <sub>2</sub> (Glucose)	Cultivable à 10°C	Cultivable à 45°C	Cultivable à 6.5% NaCl	Cultivable à 18% NaCl	Cultivable à pH 4.4	Cultivable à pH 9.6	Type d'acide lactique
Aerococcaceae	<i>Aerococcus</i>	Coques (tétrades)	-	+	-	+	-	-	+	L
Carnobacteriaceae	<i>Carnobacterium</i>	Bacilles	-	+	-	ND	-	ND	-	L
Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i>	Coques	-	+	+	+	-	+	+	L
	<i>Tetragenococcus</i>	Coques (tétrades)		+	-	+	+	Variable	+	
	<i>Vagococcus</i>	Coques		+	-	-	-		-	
Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i> <sup>a</sup>	Bacilles	Variable	Variable	Variable	Variable	-	Variable	-	D, L, DL
	<i>Pediococcus</i>	Coques (tétrades)	-	Variable	Variable	Variable	-	+	-	L, DL
	<i>Leuconostoc</i>	Coques	+	+	-	Variable	-	Variable	-	D
	<i>Oenococcus</i>	Coques	+	+	-	Variable	-	Variable	-	D
Streptococcaceae	<i>Weissella</i>	Coques (qq bacilles)	+	+	-	Variable	-	Variable	-	D, DL
	<i>Lactococcus</i> (N streptococci)	Coques	-	+	-	-	-	Variable	-	L
	<i>Streptococcus</i>	Coques	-	-	Variable	-	-	-	-	L

<sup>a</sup> le genre des *Lactobacillus* inclus les membres des 25 nouveaux genres définis dans les travaux de Zheng J *et al.*, 2020 (voir Figure 4). ND : non défini.

En 1919, Orla-Jensen propose de classer les LAB en 3 groupes distincts selon les voies de fermentation du glucose qu'elles peuvent emprunter et de leurs capacités à métaboliser les pentoses (Tableau 3). Cette classification n'a pas de valeur d'un point de vue phylogénétique, mais est encore utilisée pour des raisons pratiques. Ainsi, on trouve les LAB dites homofermentaires obligatoires qui sont capables de fermenter le glucose en lactate par la glycolyse, mais qui sont incapables de métaboliser les pentoses (Fig. 2). Ensuite, les LAB dites hétérofermentaires obligatoires (ex : bactéries du genre *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*), fermentent le glucose et le pentose par la voie des phosphokétolases pentoses. De plus, elles produisent du lactate, de l'acétate, du CO<sub>2</sub> et de faibles quantités d'éthanol (Fig. 2). Enfin les LAB dites hétérofermentaires facultatives fermentent le glucose *via* la glycolyse et les pentoses par la voie des phosphokétolases pentoses. Cette classification en trois groupes repose sur la présence ou l'absence de la FDP aldolase et de la phosphokétolase ; enzymes clés de la glycolyse et de la voie des phosphokétolases pentoses (Fig. 2 et Tableau 3).

Tableau 3 Voie de fermentation du glucose d'espèces importantes de la famille des *Lactobacillaceae*.  
Adaptée de « Encyclopedia of Food Microbiology Academic » 2<sup>e</sup> édition.

Enzymes	Homofermentaire obligatoire	Hétérofermentaire facultatif	Hétérofermentaire obligatoire
FDP aldolase	+	+	-
Phosphoketolase	-	+	+
	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. brevis</i>
	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. buchneri</i>
	<i>L. helveticus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. fermentum</i>
	<i>L. salivarius</i>	<i>L. sakei</i>	<i>L. reuteri</i>

+/- : présence/absence des enzymes du métabolisme fermentaire. FDP : fructose 1,6 -diphosphate.

### 1.3 Les LAB, des bactéries aux propriétés multiples

Les LAB ont une importance majeure pour l'Homme en raison de leur rôle dans l'industrie agroalimentaire et de leurs propriétés bénéfiques sur la santé humaine et animale.

La diversité des LAB et de leurs activités est utilisée depuis des siècles pour la préservation des aliments et la production de boissons et produits fermentés. En raison de leur longue utilisation par l'Homme, certaines LAB sont considérées comme propres à la consommation et ont acquis le statut de bactéries GRAS (Generally Regarded As Safe). Certaines LAB, sont notamment utilisées par les industriels comme ferments pour accélérer la fermentation de nombreux produits tels que les vins, le kéfir, les fromages, les cornichons, les viandes et poissons fermentés (Gänzle, 2015; Leroy and De Vuyst, 2004). La libération de produits du métabolisme par certaines LAB participe au développement de caractéristiques organoleptiques des produits fermentés (saveur, arôme, texture) (Leroy and De Vuyst, 2004). De plus, l'acidification des matrices alimentaires au cours de la fermentation et la libération de molécules antimicrobiennes (bactériocines, surfactants, peptides antimicrobiens, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) contribuent également à la conservation des aliments (Servin, 2004).

Par ailleurs, on attribue à la consommation de certaines LAB qualifiées de probiotiques, des activités bénéfiques sur la santé de l'hôte (Butel, 2014). Les probiotiques sont définis par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme des microorganismes vivants qui administrés en quantités adéquates, confèrent un avantage pour la santé de leur hôte (Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization, 2006). La majorité des bactéries probiotiques appartiennent au groupe des *Lactobacillaceae* (ex. *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. casei*, *L. rhamnosus*) et sont généralement présentes dans les produits laitiers (Tamime *et al.*, 2006).

Plus largement, les LAB sont présentes dans une grande diversité d'écosystèmes. On les trouve naturellement dans les aliments fermentés, le sol, sur les fruits et légumes, dans le microbiote des animaux et de l'Homme (Liu *et al.*, 2014). Certaines espèces ont des interactions de types commensales (bénéfice pour l'un des partis) ou mutualistes (bénéfice réciproque) avec leur hôte (Mozzi, 2016). À l'inverse, les LAB présentent également des membres parmi les plus pathogènes pour les mammifères, notamment au sein de l'ordre des *Enterococcaceae*, des *Streptococcaceae* et des *Carnobacteriaceae* (Aguirre and Collins, 1993).

## 1.4 La famille des *Lactobacillaceae*

### 1.4.1 Évolution récente de la taxonomie des *Lactobacillaceae*

Les relations taxonomiques au sein de la famille des *Lactobacillaceae* ont été révisées en 2020 par l'équipe de Sarah Lebeer (Zheng *et al.*, 2020). Les auteurs ont adopté une approche de classification dite polyphasique (Vandamme *et al.*, 1996) intégrant des paramètres génomiques, phénotypiques, métaboliques et écologiques afin de proposer de nouveaux taxons permettant d'expliquer la grande diversité au sein de cette famille. Des modifications majeures ont été apportées à l'occasion de ces travaux, notamment l'intégration de la famille *Leuconostocaceae* au sein des *Lactobacillaceae* validant ainsi la proposition de K. Makarova *et al.* (Makarova *et al.*, 2006), et la division du genre des *Lactobacillus* en 25 nouveaux genres (Fig. 3). Le genre *Pediococcus* a également été intégré aux *Lactobacillaceae* entérinant ainsi les résultats de nombreux travaux précédents (Salveti *et al.*, 2012; Zheng *et al.*, 2015). Avant 2020, le genre *Lactobacillus* contenait près de 261 espèces très diversifiées, rendant jusqu'alors l'étude et la description des membres de ce taxon difficile. L'un des apports majeurs de ce travail est le regroupement de bactéries partageant des caractéristiques génétiques, métaboliques, physiologiques et écologiques. Notamment, la nouvelle classification montre que les bactéries hétérofermentaires de la famille des *Lactobacillaceae* forment un groupe monophylétique (Fig. 3). A l'inverse, selon les auteurs, le caractère homofermentaire ne correspond pas à une innovation apparue chez l'ancêtre commun des *Lactobacillaceae*, suggérant ainsi l'émergence de ce métabolisme à plusieurs reprises par convergence évolutive. Enfin, cet arbre phylogénétique a permis la formation des nouveaux genres partageant des modes de vies similaires, tel que le genre des *Bombilactobacillus* dont les membres ont un mode de vies associé à des hôtes insectes (Fig. 3). L'adéquation entre groupes phylogénétiques et niches écologiques renforce les résultats des travaux de Zheng *et al.*, et offre ainsi la possibilité de réaliser des hypothèses sur le mode de vie des bactéries sur la base de leur position taxonomique.

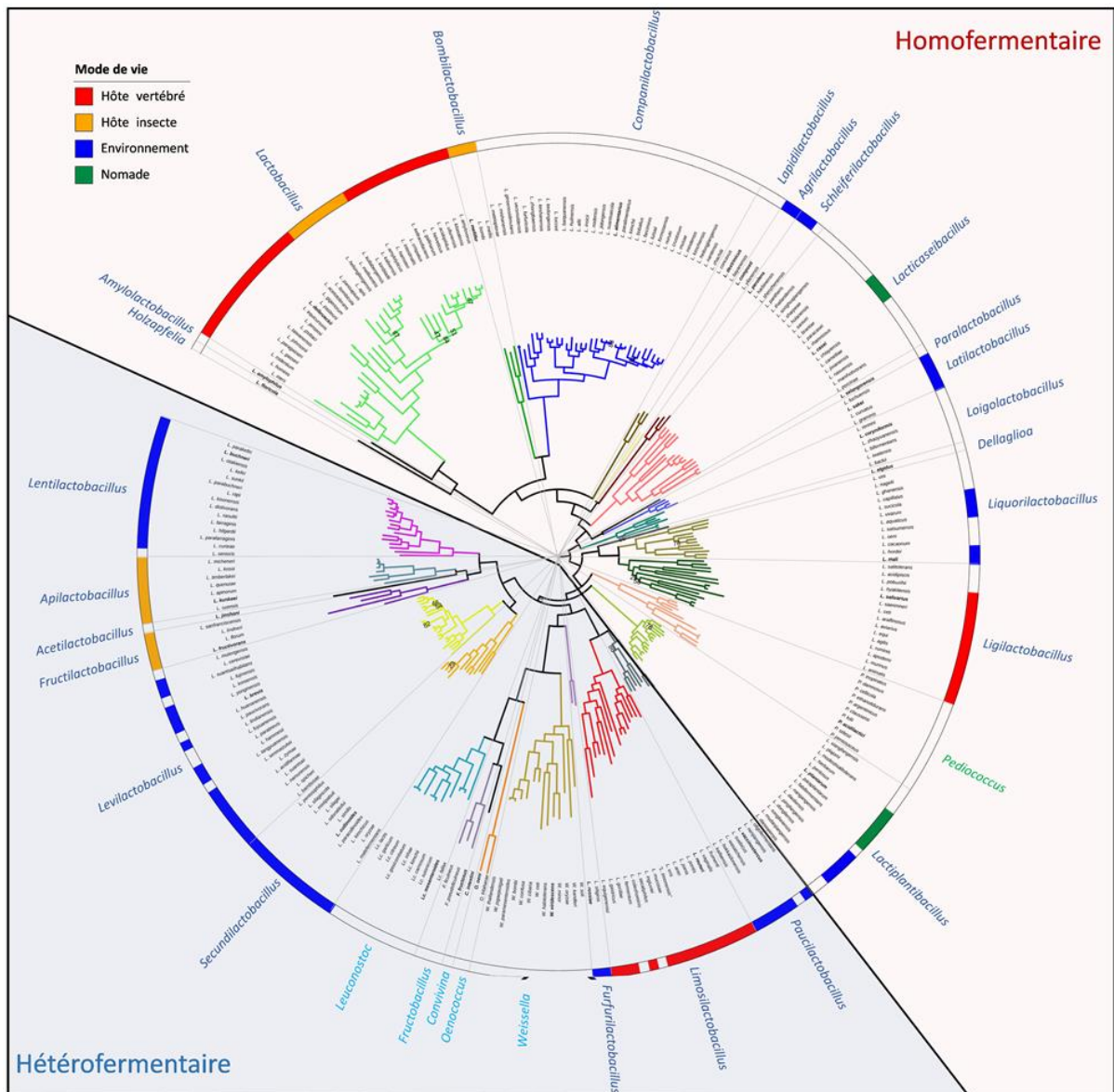


Fig. 3 Arbre phylogénétique révisé de la famille des *Lactobacillaceae*. L’anneau extérieur indique les habitats naturels présumés des espèces ; les bactéries sont présentes dans l’environnement (bleu), adaptées aux hôtes vertébrés (rouge), adaptées aux insectes (orange), nomades (transit entre différents habitats) (vert), ou non attribués (blanc). Le nom des genres en bleu foncé et bleu clair correspond respectivement aux membres du genre des *Lactobacillus* et de famille de *Leuconostocaceae* avant révision. Le terme lactobacille fait référence aux bactéries dont le genre est en bleu foncé. Adaptée de Zheng J *et al.*, 2019 et 2020.

#### 1.4.2 Caractéristiques générales des *Lactobacillaceae*

Les *Lactobacillaceae* avec les *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae* et *Streptococcaceae* appartiennent à l’ordre des *Lactobacillales* (Tableau 1). La famille des *Lactobacillaceae* contient le plus grand nombre d’espèces et la plus grande diversité bactérienne. Cette famille regroupe un ensemble de bactéries à Gram positif, non sporulantes, catalase négatives, anaérobies strictes ou aéro-anaérobies facultatives. Les bactéries présentent une morphologie coccoïde ou bacille avec des types de groupement variables selon les espèces (diplobacille, chaînette, tétrade, etc.) (Tableau 2). Le terme de « lactobacilles » fait référence aux bactéries membres de la famille des

*Lactobacillaceae* avant 2020 ; c'est-à-dire avant la révision de l'arbre phylogénétique réalisée par Zheng J *et al.* (Zheng *et al.*, 2020). Les lactobacilles sont identifiés dans l'arbre phylogénétique des *Lactobacillaceae* (Fig. 3 ; nom de genre en bleu foncé). Mis à part quelques exceptions, seuls les membres de la famille des *Lactobacillaceae* présentent des bactéries homofermentaires et hétérofermentaires obligatoires (Fig. 2 et Tableau 2). Les autres familles de *Lactobacillales*, présentent quant à elles un métabolisme de type homofermentaire ou hétérofermentaire facultatif (ex. *Carnobacteriaceae*). Le produit principal de fermentation des *Lactobacillaceae* est le lactate. L'acétate, l'éthanol, le CO<sub>2</sub> sont également produits au cours de la fermentation dans le cas des bactéries dites hétérolactiques (Fig. 2 et 3).

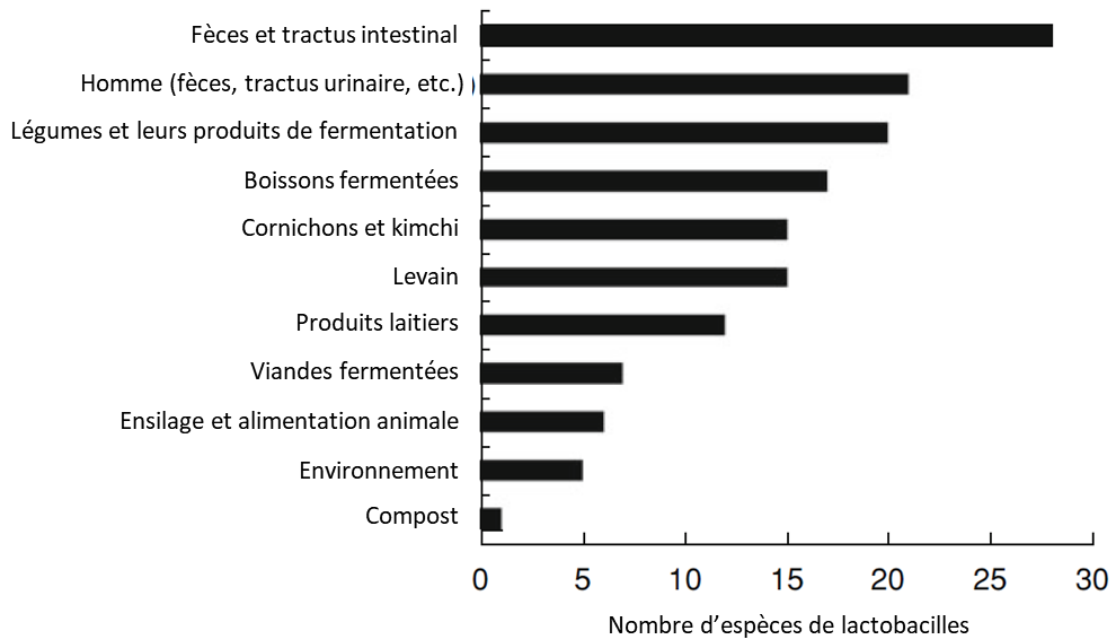


Fig. 4 Nombre d'espèces de lactobacilles identifiées dans diverses niches écologiques. Adaptée de « Lactic Acid Bacteria Fundamentals and Practice » 1<sup>er</sup> édition.

Les *Lactobacillaceae* sont présentes dans une grande diversité d'écosystèmes (Fig. 4). On les trouve dans des habitats riches en carbohydrates tels que les aliments (produits laitiers, produits à base de viandes et de poissons, vins, sur les fruits et légumes, choucroutes, ensilages et levains). De nombreuses espèces font partie de la flore microbienne normale de la bouche, du tractus gastro-intestinal (TGI) et de la flore génitale des humains et de nombreux animaux. On trouve notamment dans l'intestin les espèces *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. rhamnosus* ; de nombreuses espèces sont également identifiées dans les muqueuses stomacales (*L. antri*, *L. gastricus*, *L. acidophilus*) (Roos *et al.*, 2005) ainsi que vaginales (*L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii*, *L. vaginalis*, *L. iners*) (Jespers *et al.*, 2012).

Les infections associées aux *Lactobacillaceae* sont rares et se manifestent le plus souvent chez des patients souffrant de graves comorbidités (Aguirre and Collins, 1993; Cannon *et al.*, 2005; Salminen *et al.*, 2006; Fradiani *et al.*, 2010; Tena *et al.*, 2013; Vahabnezhad *et al.*, 2013; Callaway *et al.*, 2013). En particulier, l'innocuité des probiotiques du groupe des lactobacilles a été évaluée en Finlande par le suivi d'évolution de la bactériémie de milliers de patients entre 1990 et 2000. Les travaux n'ont montré aucune variation des infections dues aux lactobacilles durant les 10 ans de l'étude, alors que durant la même période la consommation de *L. rhamnosus* GG avait été multipliée par 6 (Salminen *et al.*, 2002).

## 2. Phages et prophages des LAB

### 2.1 Les bactériophages

#### 2.1.1 Découverte

Les bactériophages (ou phages) ont été découverts indépendamment par Frederick Twort en 1915 et par Félix d'Hérelle en 1917 (Fig. 5). La découverte de Felix d'Hérelle est associée à une épidémie de dysenterie en 1915, durant laquelle il observe que des filtrats de cultures bactériennes issues d'échantillons fécaux de patients malades ont des propriétés lytiques (Summers, 2001). En effet, il montre que l'addition des filtrats à des cultures liquides entraîne la lyse des bactéries dysentériques. De plus, il observe que l'étalement des échantillons fécaux sur milieu solide conduit à la formation de « trous » dans les tapis bactériens, appelés « plage de lyse ». Rapidement, Felix d'Hérelle comprend la nature particulière du « principe lytique » capable de se multiplier aux dépens des bactéries. Il appellera ce principe lytique « bactériophage », combinant ainsi le terme « bacteria » et le terme issu du grec « phagein » signifiant « manger » (Letarov, 2020). Le potentiel thérapeutique des bactériophages a été mis en évidence par Felix d'Hérelle quelques années après leur découverte. En 1919, ses travaux permettent le rétablissement complet d'un enfant de 12 ans atteint de dysenterie, quelques jours après l'ingestion d'une préparation de phages anti *shigella* (Gordillo Altamirano and Barr, 2019). Jusqu'à leur observation au microscope électronique par l'équipe de Ernst Ruska en 1939, l'existence et la nature des phages aura fait l'objet de vives controverses au sein de la communauté scientifique ("Die Bedeutung der Übermikroskopie für die Virusforschung | SpringerLink," 1939). Près d'un siècle plus tard, l'utilisation des bactériophages en thérapeutique représente l'alternative la plus convaincante aux antibiotiques (ATBs) pour lutter contre les bactéries multirésistantes (Gordillo Altamirano and Barr, 2019; Lin *et al.*, 2017).

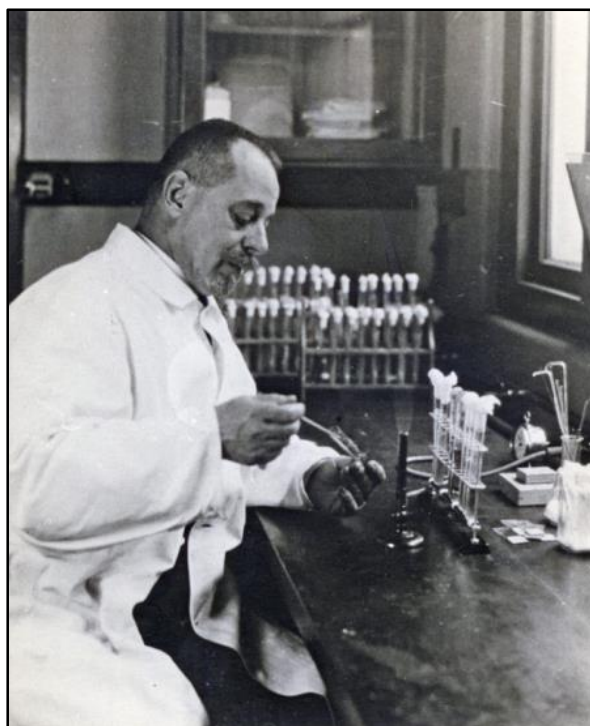


Fig. 5 Félix d'Hérelle (1873-1949) dans son laboratoire rue Olivier de Serres. Issue de la photothèque de l'institut Pasteur.



### 2.1.2 Définitions et généralités

Les bactériophages sont des virus de bactéries (“Bacteriophages - MeSH - NCBI,” 2022). Parasites obligatoires, ils détournent la machinerie cellulaire de l’hôte à leur profit pour se multiplier. Leur information génétique est portée par un acide nucléique (ADN ou ARN), qui contient les informations nécessaires à leur reproduction dans un groupe d’hôtes spécifiques. L’information génétique est généralement contenue dans une particule virale (ou virion) correspondant à une enveloppe protéique assurant la protection, le transport et l’infection des bactéries hôtes (Viruses and King, 2011) (Fig. 6).

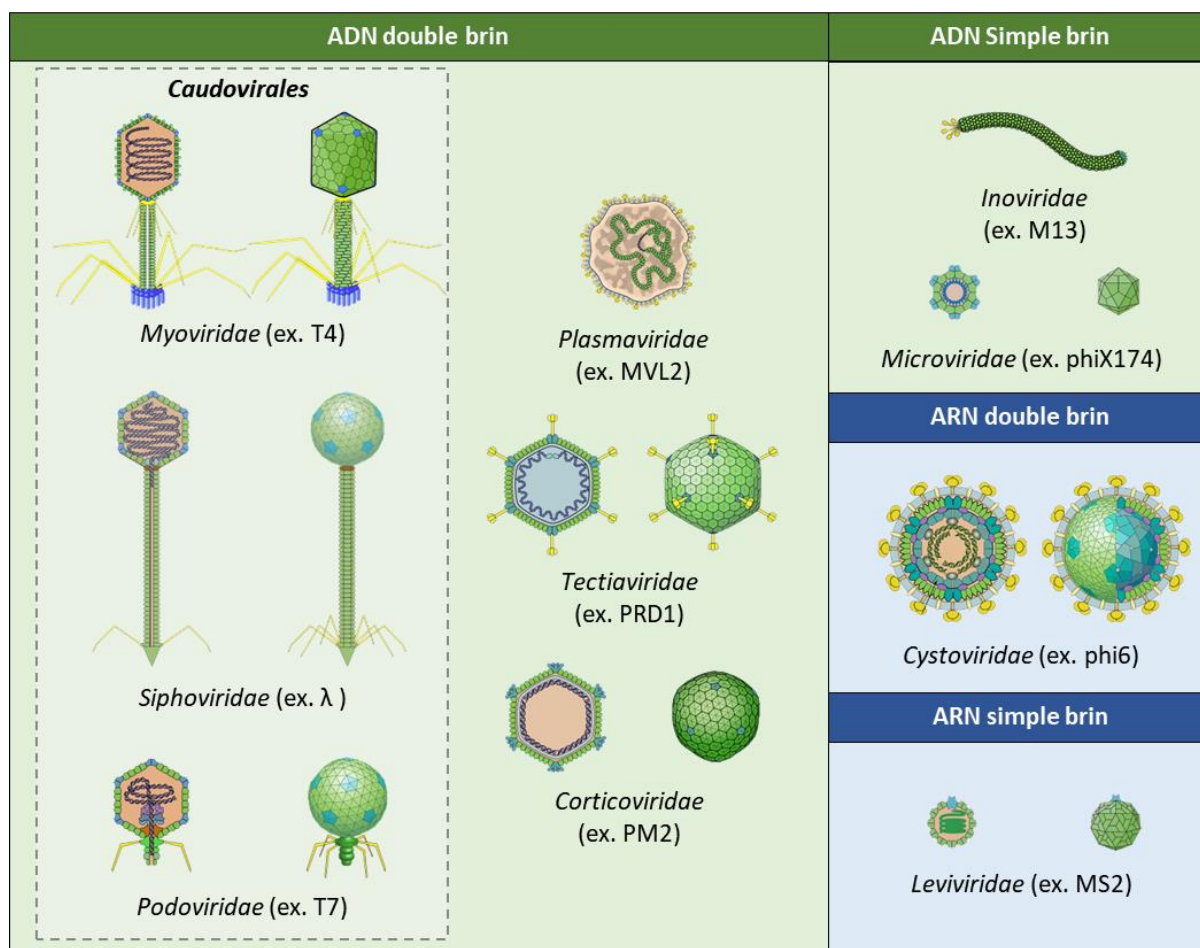


Fig. 6 Classification des bactériophages. Le genre et les familles de bactériophages ont été regroupés d’après la nature de l’acide nucléique présent dans les particules virales. Adaptée de ICTV 2011 et ViralZone.

Les phages sont les organismes les plus abondants et les plus diversifiés génétiquement sur la planète. On estime qu’il y a près de 10 fois plus de virus que de bactéries sur terre soient plus de  $10^{30}$  bactériophages (Mann, 2005; Mushegian, 2020). En raison de leur parasitisme obligatoire, les phages sont présents en grandes quantités dans l’ensemble des niches écologiques occupées par leurs hôtes. La majorité des bactéries présentes dans les écosystèmes sont non cultivables en laboratoire (Rappé and Giovannoni, 2003). C’est pourquoi il a longtemps été impossible d’étudier la diversité des bactéries et des phages qui les infectent. Les avancées en métagénomique des 20 dernières années ont révolutionné l’écologie microbienne en permettant d’identifier et de caractériser les bactéries et leurs phages à partir de toutes sortes d’échantillons (Taş *et al.*, 2021). On trouve des bactéries dans l’ensemble de la biosphère avec une estimation à plus de  $10^{29}$  cellules dans les mers, les océans, les

couches terrestres superficielles et profondes (Whitman *et al.*, 1998). En particulier, les phages sont fortement présents dans les milieux aquatiques où l'on dénombre en moyenne près de  $10^7$  virus par millilitre d'eau de mer (Mann, 2005).

Près de 96 % des phages découverts à ce jour, sont des phages de l'ordre des *Caudovirales* dits phages « caudés » dont l'ADN est présent sous une forme double brin linéaire dans des particules virales non enveloppées. Les particules virales (ou virions) des phages « caudés » se caractérisent par la présence d'un tube protéique appelé « queue » associé à une capsidite appelée « tête » enveloppant le matériel génétique du virus (Fig. 6) (Ackermann, 2007). Les queues présentent une symétrie hélicoïdale et sont généralement pourvues de structures permettant la fixation à leurs hôtes (spicules, fibres caudales) (Fig. 6 et Fig. 7). Les capsidites des *caudovirales* sont des structures icosaédriques, issues de l'assemblage d'unités protéiques appelées capsomères. Le nombre T attribué à une capsidite correspond au nombre de protéines formant un capsomère. Par exemple, le phage lambda possède une capsidite icosaédrique T=7 constituée de 72 capsomères formés de 7 protéines chacun (Fig. 7).

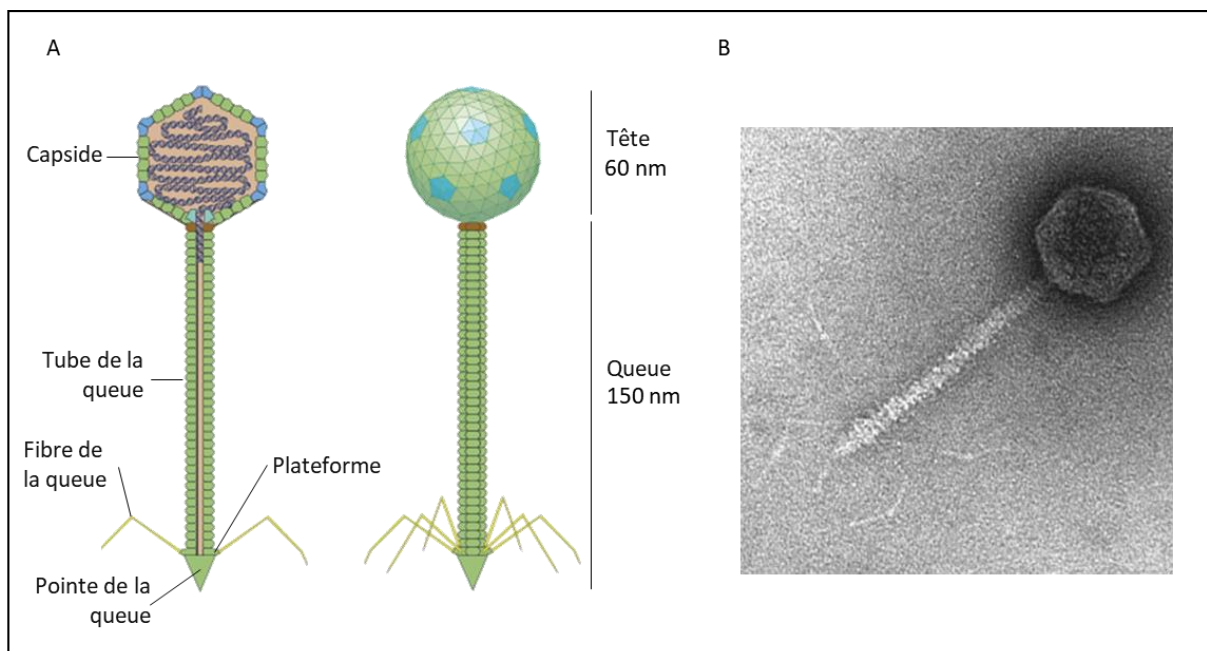


Fig. 7 Particule virale du phage  $\lambda$ . (A) Schéma d'une particule virale du phage  $\lambda$ . (B) Image de microscopie électronique à transmission d'une particule virale du phage  $\lambda$  obtenue par coloration négative à l'acétate d'uranyle. Adaptée de ViralZone et du livre « The Bacteriophages » 2<sup>ed</sup>, Oxford University Press, 2005.

Parmi les 4 % de phages non « caudés » isolés à ce jour, il existe des phages à ADN et à ARN simple brin ainsi que des phages à ARN double brin (Fig. 6). Il existe également une grande diversité de morphologies, avec des phages « cubiques », « filamenteux » ou encore des phages dits « pléomorphes » (Fig. 6). La plupart des virions sont constitués de protéines et du génome qu'ils protègent. Toutefois, on trouve également des particules virales constituées de composés ou d'enveloppes lipidiques (Ackermann, 2007; Fauquet, 1999).

### 2.1.3 Classification

#### 2.1.3.1 Classification du comité international de la taxonomie des virus (ICTV)

En 1966, le comité ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) est créé avec pour objectif principal d'établir une classification taxonomique universelle des virus. L'absence d'ancêtre commun à tous les virus est suggérée dès le premier comité en raison de la grande diversité génétique entre les virus ainsi que la diversité des hôtes qu'ils infectent. C'est pourquoi à ce jour, aucune méthode de classification universelle des virus ne fait consensus. Le principe de classification adopté par l'ICTV repose sur la comparaison de toutes propriétés ou caractéristiques pertinentes permettant de distinguer les virus en eux. Les virus peuvent être regroupés en fonction des propriétés de leurs virions (morphologiques, biophysiques, biochimiques), de la nature de leur acide nucléique ou encore du « phénotype » des infections. Toutefois, aujourd'hui, la comparaison des séquences génomiques et les relations phylogénétiques entre virus sont les critères prédominants permettant de définir un groupe taxonomique (Viruses and King, 2011).

En 1991, une étape importante est franchie lorsque l'ICTV introduit le concept d'espèce virale qui reste encore largement controversé aujourd'hui. Ainsi, l'ICTV définit une espèce virale comme « un groupe monophylétique d'éléments génétiques mobiles dont les propriétés peuvent être distinguées de celles d'autres espèces par de multiples critères » ("Code | ICTV," 2022). L'espèce virale est le niveau taxonomique le plus bas dans la hiérarchie approuvée par l'ICTV.

Aujourd'hui, la classification proposée par l'ICTV a permis de définir 1 ordre, 10 familles et 40 genres de virus de bactéries (Viruses and King, 2011). Les relations taxonomiques entre les différentes familles restent encore largement à établir bien qu'il soit peu probable que certaines familles très éloignées puissent être réunies au sein d'un groupe monophylétique.

On distingue ainsi parmi les virus de bactéries, l'ordre des *Caudovirales* contenant 3 familles, dont les *Myoviridae* (8 genres), les *Podoviridae* (11 genres) et les *Siphoviridae* (9 genres). Ainsi que 7 autres familles, dont les *Corticoviridae* (1 genre), les *Plasmaviridae* (1 genre), les *Tectiviridae* (1 genre), les *Inoviridae* (2 genres), les *Microviridae* (4 genres), les *Leviviridae* (2 genres) et les *Cystoviridae* (1 genre) (Fig. 6) (Viruses and King, 2011).

Parmi les virus appartenant à l'ordre des *Caudovirales*, les *Myoviridae* représentent environ 25 % des phages identifiés et sont caractérisés par la présence d'une longue queue contractile reposant sur une plaque basale. Les *Podoviridae* (~15 %) possèdent une queue courte et non contractile et les *Siphoviridae* (~60 %) se distinguent par de longues queues non contractiles (Ackermann, 2007) (Fig. 6 et Fig. 7).

#### 2.1.3.2 Classification de Baltimore

En 1971, David Baltimore propose une classification des virus en 6 groupes, basée sur la nature de l'acide nucléique présent dans le virion ainsi que le processus de répllication et de synthèse des ARN messager (ARNm) (Baltimore, 1971). Une septième classe sera ajoutée quelques années plus tard afin d'inclure les virus de la famille des *Hepadnaviridae* (ex. virus de l'hépatite B).

Encore très utilisée aujourd'hui, la classification de Baltimore est une classification commode utilisée parallèlement à la classification de l'ICTV (Fig. 8) (Koonin *et al.*, 2020).

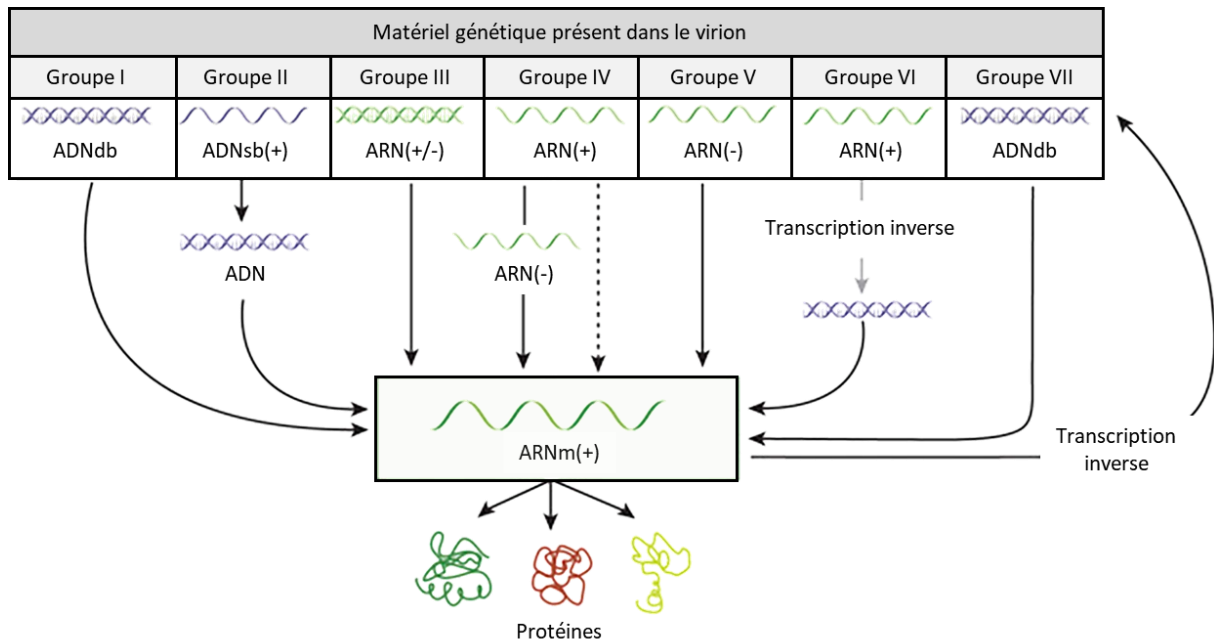


Fig. 8 Schéma des sept classes de virus définies par la classification de Baltimore. Les groupes de la classification de Baltimore sont définis comme suit : Groupe I : virus à ADN double brin. Groupe II : virus à ADN simple brin de polarité positive (+). Groupe III : virus à ARN double brin. Groupe IV : virus ARN simple brin de polarité positive (+). L'ARN génomique du virus présente la même polarité que le ou les ARNm du virus. Groupe V : virus à ARN simple brin de polarité négative (-). L'ARN génomique des virus est complémentaire du ou des l'ARNm du virus. Groupe VI : virus à ARN simple brin de polarité positive (+) se répliquant par l'intermédiaire d'ADN synthésisés par transcription inverse. Groupe VII : virus à ADN double brin se répliquant par transcription inverse d'ARN, mais incorporant dans les virions une forme d'ADNdb ou d'ARN-ADN du génome viral. Notons que la polarité des brins d'ADN ou d'ARN est définie par rapport l'ARNm auquel est attribuée une polarité positive (+). Adaptée de ViralZone.

## 2.2 Cycle de vie des bactériophages

L'infection débute par l'attachement d'un virion à la surface d'une bactérie grâce à la reconnaissance de récepteurs spécifiques, on parle d'adsorption du virus. Le virion injecte ensuite son génome dans la cellule et l'information génétique qu'il porte permet de prendre rapidement le contrôle de la cellule bactérienne. En particulier, le phage doit désactiver les mécanismes de défense et détourner la machinerie cellulaire à son profit.

À ce stade, le phage se réplique dans la cellule par l'entrée dans un cycle lytique ou dans un cycle lysogénique. La stratégie de répllication adoptée dépend de la nature du phage (virulent ou tempéré) et des conditions environnementales (Fig. 9) (Salmond and Fineran, 2015).

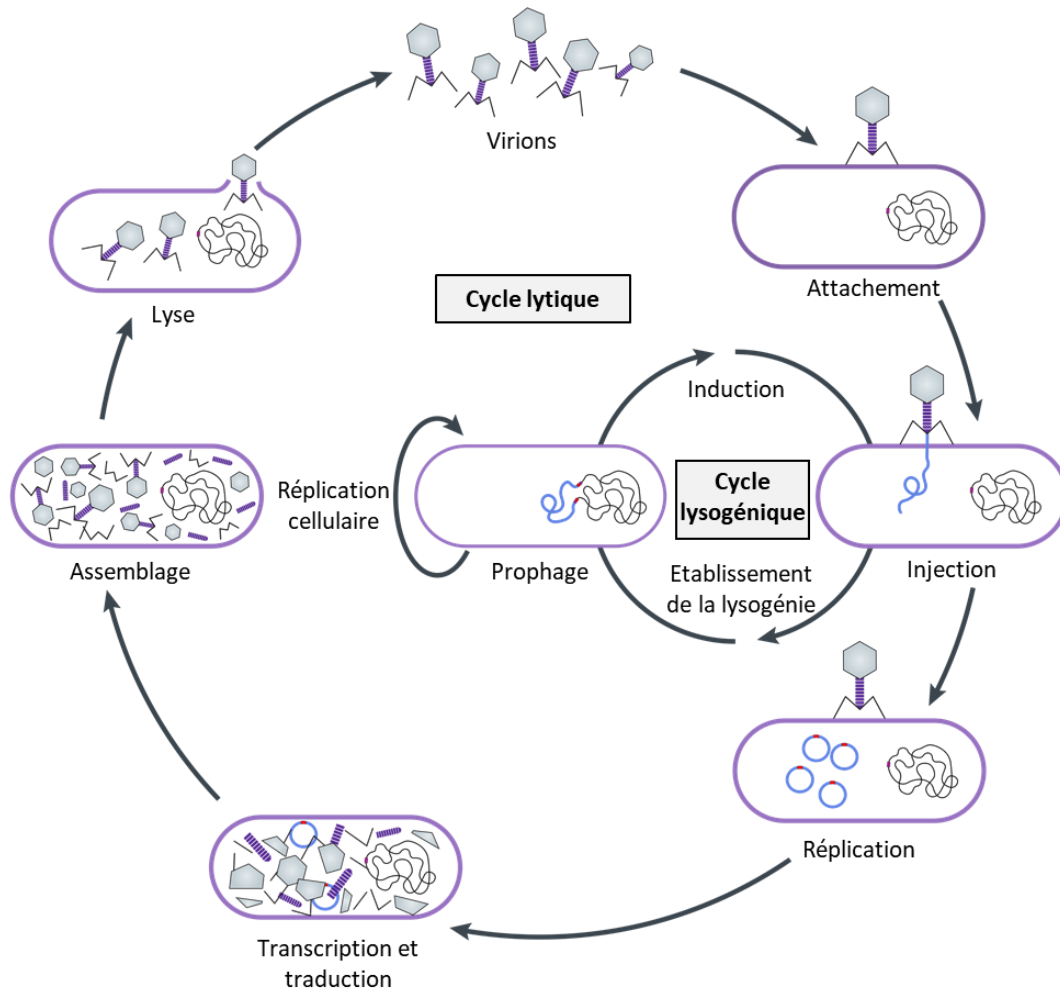


Fig. 9 Cycle de vie des phages tempérés. Adaptée de George P. C. Salmond et Peter C. Fineran 2005.

### 2.2.1 Cas des phages virulents (ou lytiques)

Les phages dits virulents (ou lytiques) se répliquent uniquement par l'entrée dans un cycle lytique aboutissant à la lyse des cellules bactériennes infectées (Fig. 9).

Ainsi, lorsque le génome phagique entre dans le cytoplasme, les gènes du phage sont rapidement transcrits afin de synthétiser les protéines permettant la réplication et la formation des particules virales. Une fois assemblés, les virions contenant chacun une copie du génome viral sortent de la cellule en entraînant la lyse bactérienne. Chez la plupart des phages, la lyse est assurée par l'action combinée des protéines codées par le système holin-endolysin. Les holins sont des protéines transmembranaires qui s'accumulent dans les membranes cellulaires en fin de cycle lytique. Elles sont capables de s'autoassembler pour former de larges « trous » dans la membrane permettant aux endolysines d'accéder au peptidoglycane. Les endolysines sont des hydrolases du peptidoglycane codées par les phages qui assurent la dégradation de la paroi bactérienne entraînant la lyse cellulaire (Cahill and Young, 2019). Selon les virus, 50 à plus de 1000 virions peuvent être libérés par bactérie. Les particules virales ainsi libérées peuvent ensuite infecter une nouvelle bactérie et entamer un nouveau cycle lytique.

Lorsqu'aucun hôte n'est présent, les virions peuvent rester infectieux durant plusieurs mois, voire plusieurs années selon le virus et les conditions environnementales (Campbell, 2003).

### 2.2.2 Cas des phages tempérés (ou lysogéniques)

Les phages dits tempérés (ou lysogéniques) peuvent se répliquer soit en entrant dans un cycle lytique comme décrit ci-dessus, soit en entrant dans un cycle lysogénique selon l'état physiologique de la bactérie (Salmond and Fineran, 2015).

La lysogénie se caractérise par la répllication du génome viral avec le génome de l'hôte, soit dans un état libre (ex. phage P1 maintenu sous la forme d'un plasmide autonome) (Łobocka *et al.*, 2004), soit par intégration au sein du chromosome bactérien (ex. phage  $\lambda$ ) (Court *et al.*, 2007).

On nomme « prophage » le génome viral des virus lorsqu'ils sont entrés dans un cycle de vie lysogénique. Historiquement, le terme de « prophage » fait uniquement référence aux génomes viraux intégrés dans le chromosome bactérien. Toutefois, la définition a été élargie pour inclure des cas tels que le prophage P1 existant sous la forme d'un plasmide autonome dans son état lysogénique (Łobocka *et al.*, 2004).

Les virus peuvent se maintenir dans leur état lysogénique pendant des milliers de générations, jusqu'à la survenue de changements environnementaux. Notamment, l'exposition à des stress (UV, agents génotoxiques, espèces réactives de l'oxygène, température) et les changements du métabolisme de l'hôte sont susceptibles d'induire l'entrée des phages en cycle lytique. Une fois induits, les prophages intégrés entament alors leur excision afin de permettre leur répllication indépendamment du chromosome bactérien (Nanda *et al.*, 2015).

D'un point de vue évolutif, la lysogénie confère un avantage majeur aux phages tempérés. En effet, elle permet aux phages d'adapter leur mode vie en fonction de l'état physiologique de leur hôte afin de maximiser leur répllication. Lorsque les ressources sont abondantes, l'entrée en cycle lytique permet de produire un grand nombre de virions. À l'inverse lorsque les ressources sont limitées, la lysogénie permet aux phages de se répliquer malgré des conditions défavorables pour leur hôte. Dans ce contexte, on comprend que les phages ont tout intérêt à ce que leurs hôtes survivent et se multiplient le plus possible. La lysogénie permet ainsi d'épargner les bactéries hôtes jusqu'à ce que des conditions plus favorables se présentent. De plus, les prophages peuvent conférer des avantages sélectifs du fait de l'apport des gènes supplémentaires à leur hôte, on parle de conversion lysogénique (Feiner *et al.*, 2015; Salmond and Fineran, 2015). Les prophages peuvent également protéger leur hôte de la surinfection par d'autres phages (Howard-Varona *et al.*, 2017). Au cours de l'évolution s'est développé des interactions complexes entre les bactéries et leurs virus, avec des relations à bénéfices réciproques loin de la simple prédation (Howard-Varona *et al.*, 2017).

L'importance du rôle écologique et évolutif joué par les prophages a pu être mesuré grâce aux avancées des 10 dernières années en métagénomique. En effet, les lysogènes (bactéries lysogéniques) représentent près de 50 % des bactéries identifiées à ce jour et peuvent contenir jusqu'à 20 % d'ADN de phages au sein de leur génome (Casjens, 2003; Touchon *et al.*, 2016). Par ailleurs, les bactéries lysogéniques sont identifiées dans un grand nombre d'écosystèmes terrestres, aquatiques ainsi que dans le microbiote des animaux (Howard-Varona *et al.*, 2017).

## 2.3 Le bactériophage Lambda : un phage tempéré modèle

### 2.3.1 Particule virale et cycle de vie

Le phage lambda (coliphage  $\lambda$  ou *Escherichia virus lambda*) est un virus caudé de la famille des *Siphoviridae* infectant les bactéries de l'espèce *Escherichia coli*. Le virion présente une tête icosaédrique de 60 nm de diamètre formée de 72 capsomères (T=7) et d'une queue d'environ 150 nm de longueur (Fig. 7). Comme tous les *Caudovirales*, la capsidie contient une copie du génome viral correspondant à un ADN double brin présent sous une forme linéaire (Viruses and King, 2011).

Le phage  $\lambda$  est le phage tempéré le plus étudié de la famille des *Siphoviridae*. Il constitue le modèle de référence par rapport auquel sont comparés tous les autres virus tempérés de cette famille.

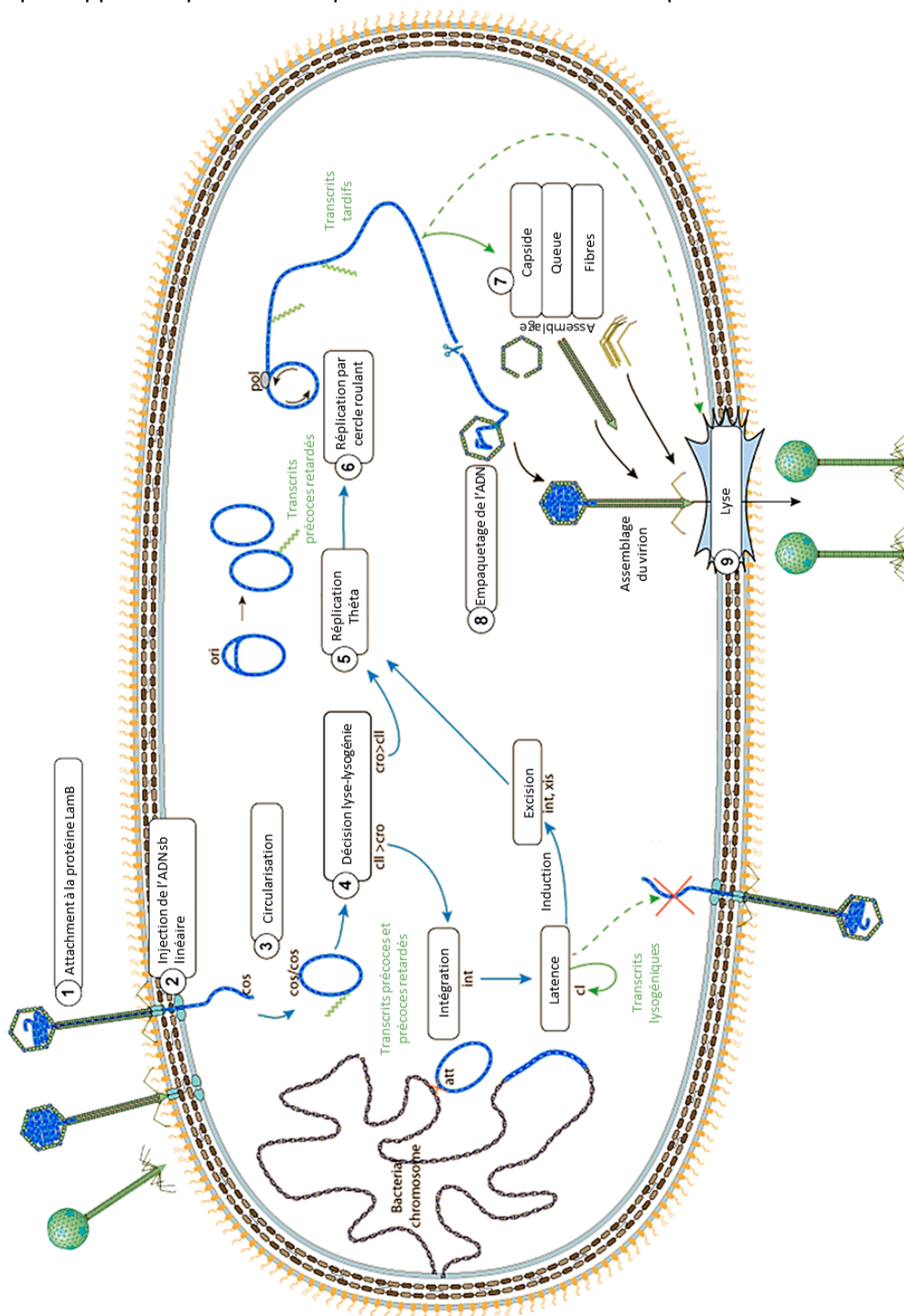


Fig. 10 Cycles de vie du phage  $\lambda$ . Adaptée de ViralZone.

La figure 10 schématise le cycle de vie du phage  $\lambda$ . L'infection démarre par l'adsorption des phages aux cellules cibles *via* l'interaction entre l'extrémité de la queue et un récepteur présent à surface de la bactérie ; une porine transmembranaire de l'opéron maltose appelée LamB. L'adsorption est suivie par l'injection de l'ADN linéaire dans le cytoplasme de l'hôte. Une fois dans la cellule, l'ADN est circularisé par une ligase bactérienne au niveau des sites *cos* (pour cohésive) présents aux extrémités du génome. Rapidement, les gènes « précoces » sont transcrits et traduits. À cette étape, le phage peut soit entrer dans un cycle lytique, soit entrer dans un cycle lysogénique conduisant à l'intégration du génome au niveau du site *attB* (attachement site B) présent dans chromosome de l'hôte (Fig. 11). L'intégration est assurée par recombinaison grâce à une intégrase phagique (appelée Int) qui reconnaît les sites d'attachements (*att*) présents à la fois sur le génome du phage (*attP*) et sur le chromosome bactérien (*attB*) (Fig. 11). De même, suite à l'induction du prophage, l'excision de l'ADN viral est assurée par recombinaison des sites *att* grâce à l'action combinée de l'excisionase (Xis) et de l'intégrase (Int) phagiques.

L'entrée en cycle lytique peut donc survenir directement après l'infection ou après induction du prophage. La machinerie cellulaire initie alors la réplication de l'ADN génomique au niveau du site *ori* (l'origine de réplication) sur le modèle de réplication  $\theta$ . Puis la machinerie virale poursuit la réplication par cercle roulant (Fig. 10). Les gènes tardifs sont ensuite exprimés et permettent notamment la synthèse des protéines de tête et de queue. L'assemblage des procapsides met en jeu l'intervention de protéines de « scaffolding ». À l'inverse, les protéines de queue s'assemblent et se lient aux fibres caudales de manière autonome. Le génome viral est empaqueté activement dans la capsidie grâce à une terminase phagique (Calendar, 2006). Enfin, les virions matures sont libérés de la cellule suite à la lyse de la paroi bactérienne grâce à l'action des protéines du système holin-endolysin (Cahill and Young, 2019).

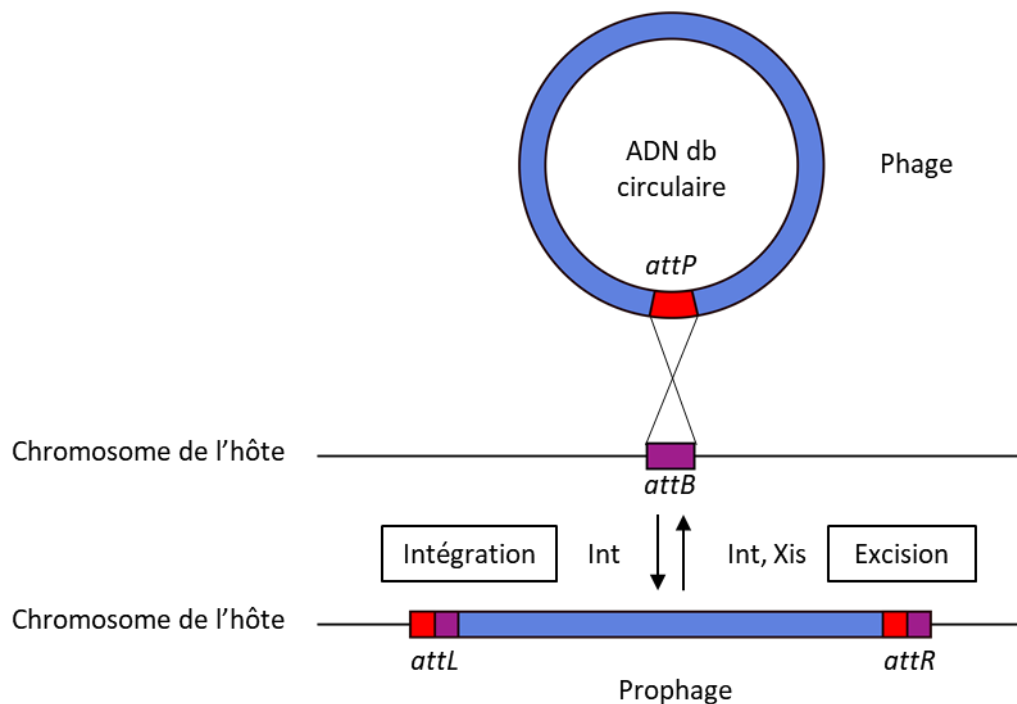


Fig. 11 Intégration et excision de l'ADN phagique. Adaptée de Donald L. Court *et al.*, 2007.



### 2.3.2 Régulation menant à la lyse ou la lysogénie

Après l'injection de l'ADN phagique dans le cytoplasme, le phage doit prendre la « décision » d'entrer dans un cycle lytique ou lysogénique. Ce processus de « décision » met en œuvre des régulations génétiques complexes qui démarrent dès l'entrée du phage dans le cytoplasme. Les mécanismes impliqués dans ce « switch » moléculaire ont été étudiés de manière très approfondie chez le phage lambda, mais restent encore largement inconnus chez les autres phages de la famille des *Siphoviridae*. Dans la littérature, les phages tempérés infectant des bactéries très éloignées d'*Escherichia coli* telles que les LAB sont très fréquemment comparés aux phages lambda. En particulier, les protéines de régulation sont souvent nommées en référence aux protéines du phage lambda d'après leurs proximités fonctionnelles et structurelles (Ladero *et al.*, 1999, 2002; García *et al.*, 1999, 2003; Nauta *et al.*, 1996; Johansen *et al.*, 2003). Par ailleurs, une majorité des phages lysogènes de LAB possèdent un système de régulation lyse-lysogénie similaire à celui du phage lambda (Ladero *et al.*, 1999, 2002; García *et al.*, 1999, 2003; Nauta *et al.*, 1996; Johansen *et al.*, 2003). C'est pourquoi dans le cadre de cette thèse nous allons détailler les régulations impliquées dans l'entrée, le maintien et la sortie du cycle lysogénique du phage lambda qui est le modèle de référence des phages tempérés de la famille des *Siphoviridae*.

#### 2.3.2.1 Organisation du génome et régulation de l'entrée en cycle lytique ou lysogénique

Le phage lambda possède un génome très organisé de 48 520 bp (Fig. 12). En effet, les gènes sont regroupés en clusters fonctionnels dans le génome, on parle d'organisation modulaire des gènes. Par exemple, on observe que les gènes impliqués dans l'excision (*xis*, *int*) sont présents sur la même unité de transcription et sous le contrôle d'un même système de régulation (Fig. 12). De même, les gènes impliqués dans la lyse, la formation de la tête et la queue sont regroupés en modules sous le contrôle du promoteur  $P_R$ . On peut grossièrement diviser le génome en 2 parties centrées sur la région opératrice *oR*. À droite du site *oR*, on trouve les gènes impliqués dans la lyse et à gauche les gènes impliqués dans l'établissement et le maintien de la lysogénie (Court *et al.*, 2007).

L'organisation spatiale du génome permet l'activation et l'inhibition de groupes de gènes de manière synchronisée et permet ainsi une régulation temporelle de leur expression. Cette organisation spatio-temporelle est cruciale pour la prise de « décision » vers le cycle lytique ou lysogénique. Elle permet également d'assurer les transitions nécessaires au bon déroulement des différentes étapes de chacune de ces voies (Casjens and Hendrix, 2015) (Fig. 12).

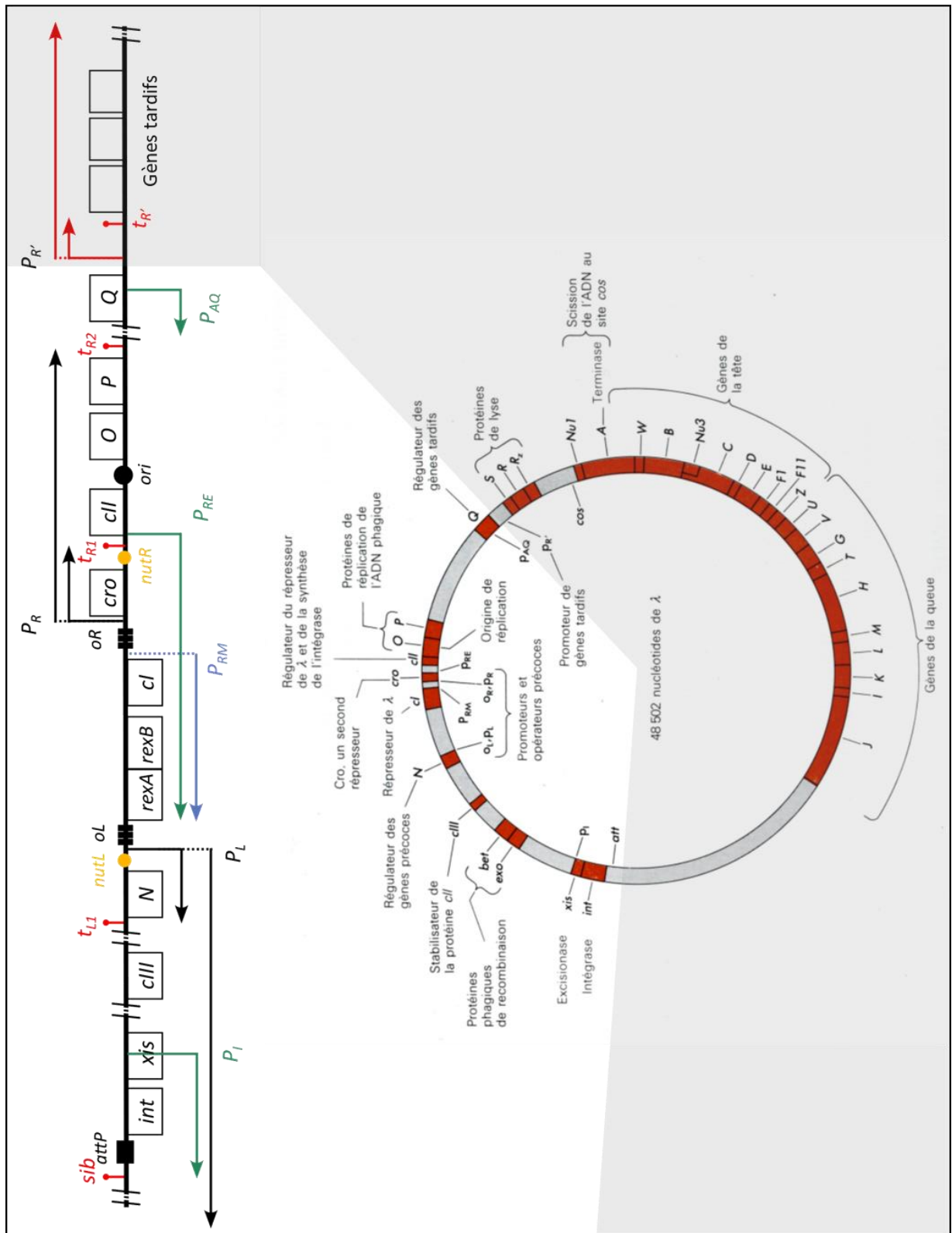


Fig. 12 Carte génétique et unités transcriptionnelles de la région régulatrice du phage  $\lambda$ . Adaptée de Donald L. Court *et al.*, 2007.

La transcription du génome viral débute dès son entrée dans le cytoplasme au niveau des promoteurs « précoces » gauche  $P_L$  (promoter left) et droit  $P_R$  (promoter right) et s'arrête rapidement au niveau des sites terminateurs  $t_{L1}$  et  $t_{R1}$  respectivement. Cette première étape permet la synthèse des protéines

« précoces » N et Cro qui sont des régulateurs de transcription (Court *et al.*, 2007) (Fig. 12, Flèches courtes de couleur noire ; Fig. 13).

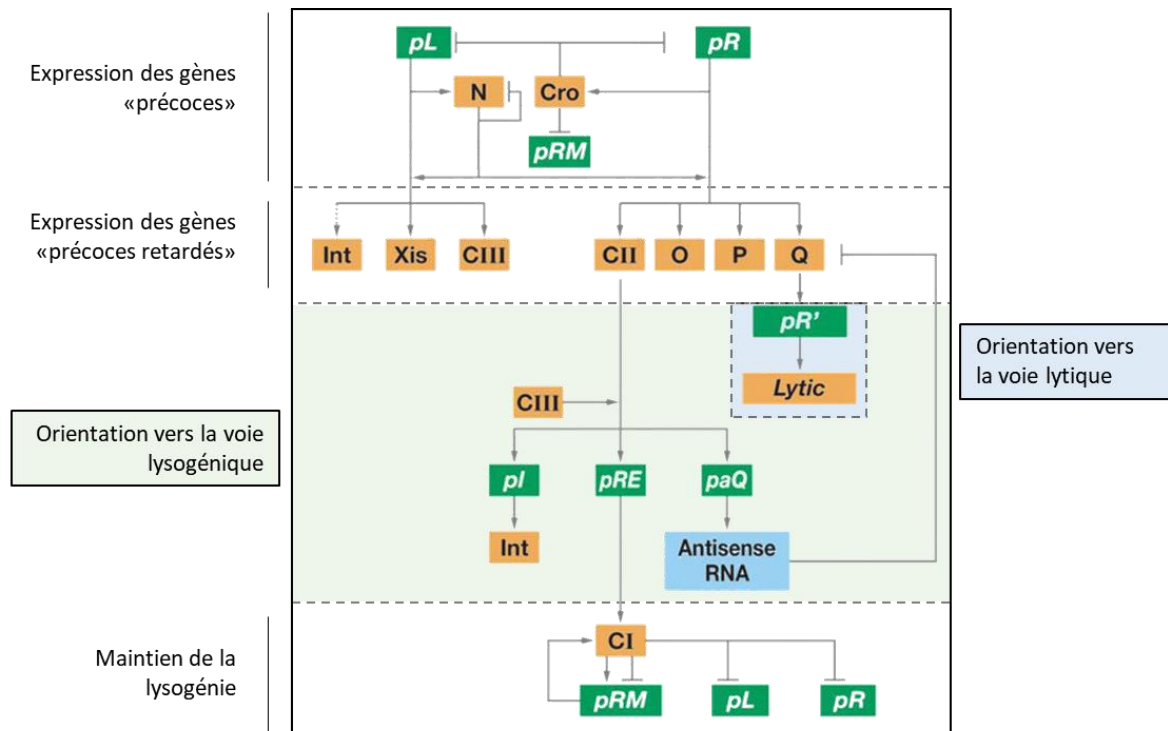


Fig. 13 Schéma des régulations génétiques du phage  $\lambda$  conduisant à la voie lytique et lysogénique. Adaptée de Amos B. Oppenheim *et al.*, 2005.

La protéine Cro est un répresseur de transcription dimérique qui agit en se fixant au niveau des sites opérateurs  $o_L$  et  $o_R$  présents en amont des promoteurs  $P_L$ ,  $P_R$  et  $P_{RM}$  (Fig. 12 et Fig. 14A). Cro se lie avec une forte affinité à l'opérateur  $o_{R3}$  empêchant ainsi la transcription de la protéine CI à partir du promoteur  $P_{RM}$  dès le début de l'infection. Comme indiqué figure 14B, plus la quantité de Cro présente dans la cellule augmente, plus les promoteurs  $P_L$ ,  $P_R$  qui contrôlent l'expression des gènes « précoces retardés » sont inhibés. Toutefois, il est important de noter que Cro est un répresseur faible du promoteur  $P_R$ , ce qui permet ainsi son expression en continu lorsque le phage progresse dans la voie lytique (Court *et al.*, 2007; Golding, 2011).

La protéine N est un anti-terminateur de transcription qui se lie sur l'ARN polymérase au niveau des sites  $nutL$  et  $nutR$  permettant ainsi d'empêcher la terminaison de transcription au niveau des terminateurs  $t_{L1}$ ,  $t_{R1}$  et  $t_{R2}$ . L'action de la protéine N conduit à l'expression de gènes « précoces retardés » impliqués à la fois dans la progression en cycle lytique ( $O$ ,  $P$  et  $Q$ ) et en cycle lysogénique ( $CII$ ,  $CIII$ ,  $Int$  et  $Xis$ ) (Fig. 12, Flèches longues de couleur noire ; Fig. 13). Les gènes "précoces retardés"  $O$  et  $P$  sont nécessaires à la réplication du génome. Le gène  $Q$  code pour un anti-terminateur de transcription empêchant la terminaison de la transcription au niveau du terminateur  $t_R$ . Cette protéine  $Q$  permet ainsi l'expression des gènes lytiques « tardifs » à partir du promoteur  $P_{R'}$  (Fig. 12, Flèche longue de couleur rouge) (Court *et al.*, 2007; Golding, 2011).

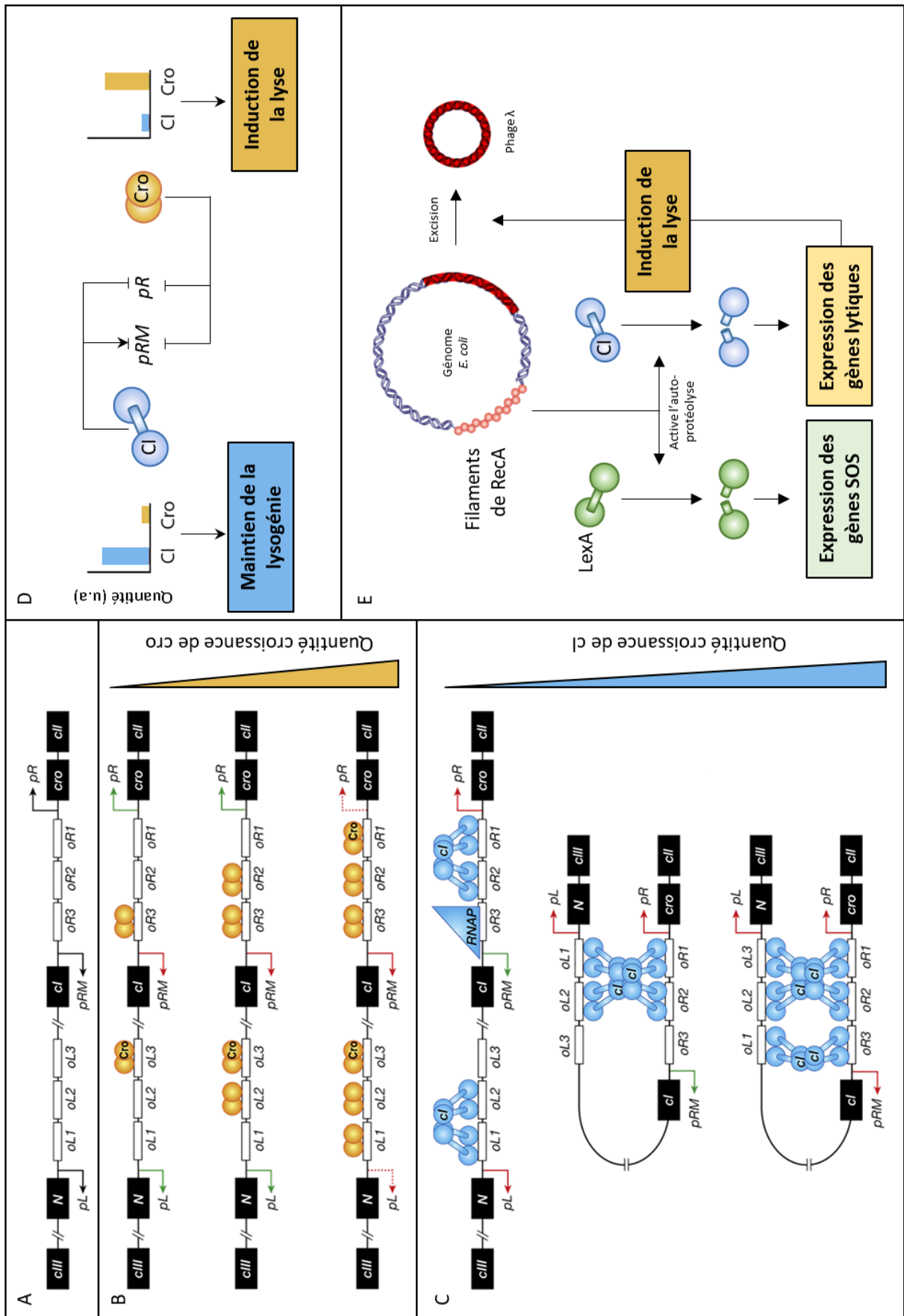


Fig. 14 Régulation du passage de la voie lysogénique à la voie lytique. Adaptée de Sangmi Lee *et al.*, 2018.

À ce stade la décision de progresser vers une voie ou l'autre dépend de la quantité de la protéine CII. Lorsque l'accumulation de CII est suffisamment élevée dans la cellule, le phage progresse vers la voie lysogénique. À l'inverse, le phage entre dans le cycle lytique lorsque la quantité de CII est faible.

CII est un activateur de transcription qui permet d'initier la transcription des promoteurs  $P_L$ ,  $P_{AQ}$  et  $P_{RE}$  qui ont un rôle critique dans l'établissement de la lysogénie (Fig. 12, Flèches de couleur verte ; Fig. 13) (Golding, 2011). La protéine CIII contribue également à l'orientation vers la voie lysogénique en empêchant la dégradation de CII par la protéase cellulaire FtsH (une protéase ATP dépendante liée à la membrane) (Casjens and Hendrix, 2015).

L'activation du promoteur  $P_{AQ}$  par CII permet la transcription d'un ARN antisens inhibant l'expression de l'anti-terminateur Q. Cette inhibition entraîne l'arrêt de l'expression des gènes lytiques tardifs comme expliqué ci-dessus. De plus, CII favorise la voie lysogénique en activant le promoteur  $P_I$ , entraînant la synthèse de la recombinaison Int qui catalyse l'intégration de l'ADN phagique dans le chromosome bactérien. Enfin, CII active le promoteur d'établissement de la répression  $P_{RE}$  qui permet la transcription et la traduction du gène *CI* (Court *et al.*, 2007; Golding, 2011).

Selon sa concentration dans la cellule, CI joue le rôle de répresseur ou d'activateur de la transcription (Fig. 14C). Tout comme Cro, la protéine CI se lie aux opérateurs  $oL$  et  $oR$ . CI présente une plus forte affinité pour les opérateurs  $oL$  et  $oR$  en position 1 et 2 qui sont occupés en priorité par rapport aux opérateurs en position 3. Dans cette configuration les promoteurs  $P_L$  et  $P_R$  sont réprimés, tandis que le promoteur  $P_{RM}$  est activé en raison du recrutement de la sous-unité sigma de l'ARN polymérase par le dimère CI (Fig. 14C). Lorsque l'ensemble des sites opérateurs sont occupés, CI empêche la transcription du promoteur  $P_{RM}$ . À l'état lysogène, CI est donc le seul gène à être exprimé par le phage. Il assure la répression stricte de  $P_L$  et  $P_R$  et contrôle sa propre transcription par régulation du promoteur  $P_{RM}$  (Golding, 2016; Ptashne, 2006).

### 2.3.2.2 Facteurs influençant le « switch » moléculaire

#### Une entrée en lyse par défaut

L'organisation spatio-temporelle du génome favorise l'entrée en mode de vie lytique. En effet, le gène *cro* est transcrit dès le début de l'infection à partir du promoteur  $P_R$  favorisant le cycle lytique. Cro réprime fortement le promoteur  $P_{RM}$  et empêche ainsi la synthèse du répresseur de lysogénie CI. De plus, il inhibe faiblement les promoteurs  $P_L$  et  $P_R$  conduisant ainsi à la diminution de la quantité de CII et CIII tout en permettant l'expression des gènes « précoces retardés » *O*, *P* et *Q*, impliqués dans la progression en cycle lytique (Golding, 2011). Or, comme expliqué précédemment, la quantité cellulaire de CII est critique pour l'orientation vers la lysogénie.

#### Facteurs liés à l'hôte

De multiples facteurs de l'hôte interagissent avec le circuit de décision lyse-lysogénie.

Notamment, la protéase de l'hôte FtsH est une enzyme capable de dégrader la protéine CII. Or, le niveau d'activité de FtsH dépend de l'état physiologique de la cellule. Ainsi, on a pu observer qu'à basse température, la diminution de l'activité de FtsH s'accompagne d'une augmentation de l'entrée du phage en cycle lysogénique. De plus, il a également été observé que les faibles températures augmentent la stabilité de la protéine CIII à laquelle FtsH est très sensible, entraînant ainsi la diminution de son activité cellulaire (Casjens and Hendrix, 2015; Court *et al.*, 2007).

De manière similaire, la quantité de RNase III permet au phage d'orienter la décision lyse-lysogénie en fonction des conditions de croissance cellulaire. En effet, en milieu riche, les concentrations cellulaires plus élevées de RNase III augmentent l'expression de l'anti-terminateur N et favorisent ainsi la progression en cycle lytique. À l'inverse, lorsque le milieu est pauvre, les concentrations de RNase III et N sont faibles et augmentent ainsi la probabilité de progression vers la lysogénie. Bien qu'elle active l'expression des gènes « précoces retardés » lytique et lysogénique, la forte concentration cellulaire de N favorise la progression en cycle lytique (Casjens and Hendrix, 2015; Court *et al.*, 2007).

Il a également été montré que le nombre de particules de phages infectant une cellule influence la décision lyse-lysogénie. Notamment, l'infection d'une cellule par de multiples phages favorise l'entrée dans le cycle lysogénique en raison de l'augmentation de la quantité de la protéine CII produite par les multiples phages (Kobiler *et al.*, 2005; Zeng *et al.*, 2010).

De même, il a été démontré que plus les cellules infectées ont un volume important, moins la probabilité que les phages choisissent la voie lysogène est élevée. La raison proposée pour expliquer ces observations est la dilution de CII dans les cellules. En d'autres termes, les concentrations de CII atteignent plus difficilement le seuil nécessaire à l'entrée en cycle lysogénique dans des cellules volumineuses (St-Pierre and Endy, 2008).

### 2.3.3 Maintien et sortie de l'état lysogénique

Une fois intégré dans le génome, l'état lysogène est stable et le phage peut se répliquer avec le chromosome bactérien durant des milliers de générations. Comme expliqué précédemment, le maintien dans le cycle lysogénique est assuré par le régulateur CI. La protéine CI inhibe fortement la transcription des promoteurs  $P_L$  et  $P_R$ , tout en régulant sa propre expression au niveau du promoteur  $P_{RM}$  (Fig. 14C) (Ptashne, 2006). En plus de réprimer l'expression des gènes phagiques, CI empêche également la surinfection en bloquant l'expression des gènes lytiques des phages entrants. C'est pourquoi, CI est parfois qualifié de « répresseur d'immunité » (Thomason *et al.*, 2019).

La sortie de l'état lysogénique est provoquée par l'exposition des bactéries à divers stress environnementaux, on parle d'induction du prophage (Nanda *et al.*, 2015). Ce phénomène d'induction a été observé pour la 1<sup>re</sup> fois en 1950 par André Lwoff au cours d'une expérience lors de laquelle il démontre l'existence de phages « dormant » dans des cellules d'*Escherichia coli* et le déclenchement de leur entrée en lyse suite à un traitement aux rayons ultraviolets (Lwoff, 1953).

L'entrée en cycle lytique du phage lambda implique la dégradation du régulateur CI et l'induction du répresseur Cro. Lorsque la quantité de CI diminue, Cro est synthétisé ce qui entraîne une compétition entre les 2 régulateurs pour l'accès aux sites opérateurs ( $o_R$ ,  $o_L$ ). De cette manière, le couple Cro et CI autorégule négativement leurs transcriptions et forment ainsi un système « senseur » permettant d'entrer en lyse lorsque le seuil d'activation définit par la quantité cellulaire de Cro est atteint (Fig. 14D). Ainsi, lorsque la quantité de Cro est suffisamment importante, le phage entre en cycle lytique. À l'inverse, le phage se maintient en lysogénie lorsque Cro est présent en faible quantité. Une fois induit, l'entrée en cycle lytique est irréversible et conduit à l'excision du phage ainsi qu'à une progression lytique similaire à celle s'établissant en début d'infection (Fig. 10) (Golding, 2016; Ptashne, 2006).

L'induction du prophage peut être due à des lésions de l'ADN bactérien occasionnées par l'exposition à des agents génotoxiques (ex. mitomycine C, rayons UV). Les dommages à l'ADN entraînent l'expression de nombreux gènes de la réponse SOS impliqués dans la réparation de l'ADN (Nanda *et al.*, 2015). En situation normale, les gènes de la réponse SOS sont réprimés par le répresseur LexA. Toutefois, lorsque l'ADN bactérien subit des dommages, la protéine RecA interagit avec les ADN simple brin du chromosome et forment des filaments nucléoprotéiques ADN-RecA. L'accumulation de ces

filaments ADN-RecA, favorisent l'autoprotéolyse du répresseur LexA et de la protéine CI qui partagent une similarité structurelle (Nanda *et al.*, 2015). L'inactivation de CI permet ainsi l'expression de Cro qui inhibe en retour la transcription de CI et entraîne ainsi le phage dans un cycle lytique (Fig. 14D-E) (Golding, 2016; Ptashne, 2006).

## 2.4 Les phages de LAB : problèmes et opportunités

### 2.4.1 Les phages de LAB : des ennemis de l'industrie

Toutes les industries utilisant des LAB peuvent être affectées par les bactériophages. En effet, les problèmes liés aux phages touchent aussi bien l'industrie alimentaire que les industries pharmaceutiques, chimiques ou encore les usines produisant des pesticides (Samson and Moineau, 2013).

Les phages sont particulièrement problématiques pour les fermentations alimentaires, notamment dans l'industrie de la transformation du lait où ils sont la principale cause d'échec des fermentations. La production de produits tels que les yaourts ou certains fromages (ex. camembert, brebis, chèvre) repose sur l'acidification du lait par des bactéries lactiques aussi appelées ferments lactiques. La multiplication des phages conduit à une diminution, voire à un arrêt total de l'acidification par les bactéries. Les phages peuvent ainsi engendrer des pertes économiques importantes en retardant les processus de fabrication, en altérant la qualité des produits ou dans les cas les plus graves, en entraînant la perte totale des produits alimentaires (Pujato *et al.*, 2019; Samson and Moineau, 2013). En raison leur fort impact sur les fermentations et de l'importance économique de l'industrie de transformation du lait, les phages infectant les ferments lactiques sont les mieux caractérisés du groupe des bactéries lactiques (Klaenhammer *et al.*, 2002). Les LAB les plus utilisées comme ferments lactiques sont principalement des bactéries de l'espèce *Lactococcus lactis* et *Streptococcus thermophilus* ainsi que les bactéries du genre *Leuconostoc* et du groupe des lactobacilles (Klaenhammer *et al.*, 2002). Les lactobacilles sont notamment très utilisés pour la production de fromages et des yaourts (Mahony and van Sinderen, 2014). De plus, ils sont également utilisés dans d'autres procédés alimentaires tels que la fermentation du soja, de la choucroute (Lu *et al.*, 2003), de certaines bières traditionnelles (Sawadogo-Lingani *et al.*, 2007), ou encore la fermentation des fèves de cacao (Camu *et al.*, 2007).

### 2.4.2 Diversité des phages de LAB

Il existe une grande diversité de phages infectant les bactéries lactiques (Ackermann, 2007). Tous les phages de LAB identifiés appartiennent à l'ordre des *Caudovirales* et la majorité des phages sont membres de la famille des *Siphoviridae* (Mahony *et al.*, 2012). On trouve des phages aussi bien lytiques que lysogéniques.

À ce jour, tous les phages de *Streptococcus thermophilus* et de leuconostoques isolés de produits laitiers sont membres de la famille des *Siphoviridae* (Ali *et al.*, 2013; Quiberoni *et al.*, 2010). De même, la majorité des phages de lactocoques appartiennent à la famille des *Siphoviridae* et seuls 2 phages de la famille des *Podoviridae* ont été identifiés (Kotsonis *et al.*, 2008).

Près de 65 % des phages de lactobacilles appartiennent à la famille des *Siphoviridae*, et les 35 % restant sont membres de la famille des *Myoviridae* (Ackermann, 2007). Seul un phage de la famille des *Podoviridae* a été identifié à ce jour (Yoon *et al.*, 2002).

En raison de leur impact économique, beaucoup de phages de lactobacilles ont été isolés de produits laitiers. Par exemple, le premier phage infectant des bactéries de la famille de *L. casei* a été isolé d'une fermentation anormale de lait fermenté de la marque Yakult en 1970 (Watanabe *et al.*, 1970). De même, de nombreux phages infectants *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. fermentum* ont été isolés de yaourts et autres produits laitiers fermentés (Kiliç *et al.*, 1996).

Enfin, des travaux ont également montré que les phages de lactobacilles pourraient être impliqués dans la disparition des lactobacilles présents dans la flore vaginale lors des vaginoses bactériennes (Kiliç *et al.*, 2001).

### 2.4.3 Les sources de phages

Il existe diverses sources de phages dans les industries fermentaires, qui varient selon les types de produits utilisés, les équipements et la mise en place de stratégies d'hygiène.

Les principales sources de phages sont les produits et les ingrédients naturels qui entrent dans les usines (Garneau and Moineau, 2011). Par exemple, il a été montré que près de 10 % d'échantillons de laits issus de différentes laiteries en Espagne contiennent des phages viables de *Lactococcus lactis* (Madera *et al.*, 2004). De même, des phages de lactocoques et de streptocoques ont été détectés dans 37 % des échantillons de lait cru utilisés pour la production de yaourt (del Rio *et al.*, 2007). Le recyclage de produits fermentés est une pratique couramment utilisée par les industriels qui représente également un risque majeur de prolifération des phages (Hinrichs, 2001).

Une autre source d'importante de virus est la présence de prophages dans les ferments lactiques.

En effet, on trouve de nombreuses bactéries lysogéniques parmi les LAB utilisées comme ferments lactiques. Il a été montré que certaines LAB peuvent contenir jusqu'à 6 prophages (Chopin *et al.*, 2001) et que près de 92 % des bactéries du « groupe des *L. casei* » contiennent des séquences phagiques, dont 71 % sont des séquences phagiques complètes inductibles par la mitomycine C (Mercanti *et al.*, 2011; Pujato *et al.*, 2019).

Comme expliqué précédemment, dans certaines conditions de stress (température, osmolarité, antimicrobiens, UV), les prophages peuvent être induits et entrer dans un cycle lytique. L'induction peut également se produire de manière spontanée avec une fréquence atteignant près de 9 % chez certains LAB (Lunde *et al.*, 2003). Ainsi, si des souches sensibles sont présentes dans les ferments, les lysogènes peuvent être responsables de la réduction ou l'arrêt de la fermentation lactique. C'est pourquoi, afin d'éviter ces situations, une caractérisation rigoureuse des bactéries lysogènes doit être menée avant leur utilisation comme ferments.

Enfin, les particules virales sont capables de disséminer par les airs. En effet, la manipulation de produits contaminés génère des aérosols qui disséminent des phages dans les installations de fermentation (Verreault *et al.*, 2008). C'est pourquoi les phages sont omniprésents et peuvent être détectés sur des surfaces telles que les murs, le matériel de nettoyage, les équipements ou encore les sols (Verreault *et al.*, 2011).

### 2.4.4 Les stratégies d'élimination

L'élimination des phages dans les industries fermentaires est impossible étant donné qu'ils sont présents dans les produits bruts et qu'ils circulent par les airs. De plus, à ce jour aucune méthode d'élimination n'a montré une efficacité permettant de lutter contre tous les phages ou permettant de



respecter les contraintes liées aux équipements et à la qualité des produits de toutes les industries fermentaires. C'est pourquoi les stratégies de gestion des phages ont pour objectifs de contrôler leurs multiplication et de réduire leur dissémination. On distingue les stratégies de contrôle utilisant des approches physiques (ex. chauffage, filtration, haute pression, UV, photocatalyse), les approches chimiques (ex. désinfectants) et les approches biologiques (ex. choix des souches de fermentation, utilisation alternée de ferments différents) (Marcó *et al.*, 2012).

La pasteurisation du lait cru est un procédé important de l'industrie du lait qui permet d'inactiver par la chaleur les bactéries pathogènes et les bactéries d'altération avant l'addition des ferments lactiques. Bien qu'il a été montré que le traitement par la chaleur permet de réduire l'infectivité des virions, les températures et les durées de traitement des protocoles classiques de pasteurisation sont insuffisants pour permettre l'élimination de la plupart des phages de LAB (Madera *et al.*, 2004). C'est pourquoi, d'autres stratégies sont mises en place dans l'industrie de transformation du lait afin de contrôler la prolifération des phages.

L'utilisation de désinfectants fait partie des approches les plus efficaces et les plus communément utilisées. Néanmoins, leur efficacité varie fortement selon les phages de LAB à traiter. Par exemple, l'hypochlorite de sodium présente une efficacité à des concentrations parfois supérieures aux limites autorisées. L'acide peracétique fait partie des biocides les plus efficaces. Il permet notamment une élimination d'un large spectre de virions sans altérer la qualité des aliments et à des concentrations compatibles avec les installations industrielles (Garneau and Moineau, 2011; Guglielmotti *et al.*, 2011).

Une des approches de contrôle les plus anciennes est l'utilisation alternée de ferments lactiques différents. Toutefois, cette approche nécessite de connaître la composition des ferments utilisés, ce qui n'est pas toujours le cas dans certaines industries (Połaska and Sokołowska, 2019).

Pour finir, l'utilisation d'une combinaison d'approches est recommandée, à la fois pour des questions d'efficacité ainsi que pour éviter l'émergence des phénomènes de résistance.

#### **2.4.5 Utilisations des phages de LAB**

Les phages de LAB peuvent être utilisés comme agents de biocontrôle afin d'éliminer ou de prévenir la multiplication de pathogènes ou de bactéries d'altération (Cooper, 2016; Połaska and Sokołowska, 2019). Par exemple, des phages peuvent être utilisés pour contrôler le développement de certaines LAB telles que *L. casei* et *L. brevis* qui sont des bactéries fréquemment associées à l'altération de bières non pasteurisées (Asano *et al.*, 2007). De nombreux produits à base de phages sont disponibles dans le commerce pour le contrôle des pathogènes tels que les produits de la marque « Intesti-bacteriophage » contenant un cocktail de phages qui ciblent des streptocoques et des entérocoques (de Melo *et al.*, 2018). Dans ce contexte, l'utilisation de phages présente l'avantage de pouvoir cibler certaines souches spécifiquement sans affecter les bactéries bénéfiques présentes dans les ferments ou dans la flore microbienne normale des animaux. De plus, les phages conservent leurs activités contre les bactéries résistantes aux antibiotiques, ils n'endommagent pas les équipements, n'altèrent pas les propriétés organoleptiques des aliments et sont inoffensifs pour l'Homme (Bruttin and Brüßow, 2005; García *et al.*, 2008). En effet, les phages sont omniprésents dans les aliments et interagissent constamment avec l'Homme et les animaux (Hagens and Loessner, 2010).

L'utilisation des phages dans l'industrie comme stratégie de bioprotection reste encore peu développée en raison de freins réglementaires et à un certain nombre de difficultés. Notamment, il a

été montré que l'utilisation de phages pourrait contribuer à la dissémination de la résistance aux antibiotiques en augmentant les transferts horizontaux de gènes (Lekunberri *et al.*, 2017). De plus, l'utilisation de phages lytiques est obligatoire étant donné que les phages lysogéniques ne permettent pas une élimination totale des bactéries et contribuent à l'acquisition de gènes de résistance (Haaber *et al.*, 2016). Par ailleurs, l'utilisation de phages comme agent de désinfection nécessite le développement de cocktails complexes formés de divers phages ciblant un même pathogène afin d'éviter la sélection de bactéries résistantes. Enfin, leur efficacité contre les biofilms de pathogènes est limitée en raison de leur faible capacité de pénétration au sein des biofilms et de l'état physiologique ralenti des certaines bactéries dites « persistantes » au sein du biofilm (Price and Chapman, 2018; Salmond and Fineran, 2015).

### **3. Utilisation des propriétés probiotiques et antimicrobiennes des lactobacilles**

Le groupe des lactobacilles est un taxon comportant parmi les microorganismes les plus importants pour l'industrie. En effet, il contient le plus grand nombre de bactéries utilisées dans la fermentation de produits alimentaires, le plus grand nombre d'espèces bactériennes reconnues comme GRAS et le plus grand nombre de bactéries aux propriétés dites probiotiques.

#### **3.1 Rôles probiotiques des *Lactobacillaceae***

##### **3.1.1 Les probiotiques : définition et généralités**

La consommation de produits fermentés par l'Homme remonte à plusieurs millénaires avant Jésus-Christ (av. J.-C.). Des vestiges archéologiques ont notamment permis de mettre en évidence la présence de boissons fermentées dans des jarres de poterie d'un village néolithique de la province du Henan en Chine, il y a près de 7 000 ans av. J.-C. (McGovern *et al.*, 2004). De même, des traces écrites égyptiennes, grecques et romaines font référence à la consommation de produits laitiers fermentés 7000 à 2000 ans av. J.-C. (Gasbarrini *et al.*, 2016). Ces observations archéologiques suggèrent que les Hommes consommaient et utilisaient des bactéries lactiques bien avant la découverte de leur rôle dans les fermentations par Louis Pasteur au début du 20<sup>e</sup> siècle. En 1907, Élie Metchnikoff établit un lien, entre la consommation de produits laitiers fermentés contenant la bactérie *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (anciennement *Lactobacillus bulgaricus*) et la longévité des membres d'un village en Bulgarie (Mackowiak, 2013). Quelques années plus tard est publiée l'une des premières études montrant que l'utilisation de lactobacilles (*Lactobacillus acidophilus*) entraîne l'amélioration de l'état de santé de patients souffrant de constipation chronique, de diarrhée ou d'eczéma (Fig. 15) (Gupta and Garg, 2009). Ces découvertes donnent naissance à l'idée que des microorganismes peuvent avoir des effets bénéfiques sur la santé de leur hôte. De tels microorganismes sont qualifiés de probiotiques par Werner Kollath en 1953.



Fig. 15 Elie Metchnikoff (1845-1916) dans son laboratoire à l'Institut Pasteur. Issue de la photothèque de l'Institut Pasteur.

Les probiotiques sont officiellement reconnus en 2001 par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme « des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, confèrent un avantage pour la santé de leur hôte » (Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization, 2006).

L'entreprise japonaise « Yakult Honsha » commercialise en 1935 pour la 1<sup>re</sup> fois une boisson fermentée (le Yakult) à base de la bactérie lactique *Lactocaseibacillus casei* Shirota isolée 5 ans plutôt par le scientifique Japonais Minoru Shirota. Moins d'un siècle plus tard, la consommation de produits contenant des probiotiques connaît une forte progression en Occident en raison des nombreux bénéfices attribués à ces microorganismes. Notamment, les probiotiques font partie des suppléments alimentaires les plus consommés aux États-Unis d'Amérique, avec un nombre de consommateurs multiplié par 4 entre 2007 et 2012 (Clarke *et al.*, 2015). Les microorganismes probiotiques sont majoritairement incorporés dans des produits laitiers fermentés, tels que le lait fermenté, le fromage, le yaourt, etc. Ils sont également délivrés dans des produits céréaliers, des produits à base de soja, ou encore dans des jus de fruits (Dias *et al.*, 2018; Ewe *et al.*, 2010).

Les microorganismes majoritairement utilisés dans les préparations probiotiques industrielles sont les lactobacilles et les bifidobactéries (Tableau 4). En 2020, une étude a notamment montré que sur plus de 1000 essais cliniques enregistrés sur la plateforme « International Clinical Trials Registry Platform » de l'OMS, les deux microorganismes les plus étudiés pour leurs activités probiotiques sont *L. rhamnosus* GG et *B. animalis* ssp (Dronkers *et al.*, 2020).

Tableau 4 Principaux microorganismes utilisés pour leurs activités probiotiques. Adaptée de M.-J. Butel., 2014 et Williams NT., 2010

Bactéries			Levures
Lactobacilles	Bifidobactéries	Autres espèces bactériennes	Saccharomycètes
<i>L. rhamnosus GG</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	
<i>L. bulgaricus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	
<i>L. casei</i>	<i>B. breve</i>	<i>Escherichia coli Nissle</i>	
<i>L. crispatus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
<i>L. fermentum</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>	
<i>L. gasseri</i>	<i>B. longum</i>		
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. lactis</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			

Plusieurs décennies de recherche sur les bactéries probiotiques ont conduit à la multiplication d'allégations sur leurs bénéfices en santé humaine. Toutefois, en raison de résultats contradictoires, les nombreux effets bénéfiques attribués aux probiotiques sont sujets à controverse et suscitent de vives oppositions au sein de la communauté scientifique. Il est important de comprendre que les activités probiotiques sont largement dépendantes des souches et de l'environnement. Ainsi, les effets d'un probiotique peuvent varier en fonction de l'état de l'hôte, de la composition du microbiote et de différents facteurs environnementaux (Abildgaard *et al.*, 2019; Andriantsoanirina *et al.*, 2014; He *et al.*, 2001; Jafarnejad *et al.*, 2016; Pelto *et al.*, 1998; Roessler *et al.*, 2008; Suwal *et al.*, 2018). Cette variabilité explique en partie la publication de nombreux résultats cliniques contradictoires et rend ainsi nécessaire la caractérisation précise des souches lors d'utilisations industrielles. En effet, une souche probiotique peut avoir des effets bénéfiques dans une condition donnée et n'avoir aucune activité dans des conditions différentes. Malgré le potentiel préventif aujourd'hui avéré de certaines souches, l'utilisation de probiotiques en médecine humaine n'est pas autorisée par les agences de régulations européennes « European Food Safety Authority » (EFSA) et Étasuniennes « Food and Drug Administration » (Rijkers *et al.*, 2011; Saldanha, 2008), bien que le potentiel préventif de certaines souches est aujourd'hui avéré. En 2010, une étape importante est franchie lorsque l'EFSA approuve la relation de cause à effet entre la consommation de bactéries lactiques (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*) dans le yaourt et l'amélioration de la digestion du lactose chez les personnes souffrant de troubles digestifs (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), 2010). Cette validation s'explique principalement par le fait que le mécanisme d'action mis en jeu dans l'amélioration des troubles digestifs est élucidé. Les bactéries du yaourt produisent des  $\beta$ -galactosidases capables de cliver du lactose, améliorant ainsi sa digestion dans l'intestin. Par ailleurs, l'ISAPP « International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics » déclare en 2013 un consensus scientifique sur certaines activités de plusieurs groupes taxonomiques telles que l'inhibition de pathogènes ou la production de métabolites et d'enzymes bénéfiques (ex : la  $\beta$ -galactosidase chez *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*) (Hill *et al.*, 2014). À l'inverse, ils précisent également que certaines activités sont spécifiques de certaines espèces voire de certaines souches (Hill *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2008). À ce stade, il apparaît nécessaire de poursuivre le travail de recherche clinique et le travail de recherche fondamentale. Les enjeux sont de mieux évaluer les effets

des probiotiques sur la santé humaine et de mieux caractériser les mécanismes responsables de ces effets.

Les résultats cliniques les plus prometteurs suggèrent des effets bénéfiques (préventifs ou curatifs) sur des troubles du tractus gastro-intestinal (TGI) tels que le syndrome du côlon irritable (Moayyedi *et al.*, 2010) et les diarrhées. En particulier, les diarrhées aiguës (Allen *et al.*, 2010; Sazawal *et al.*, 2006), les diarrhées provoquées par les traitements antibiotiques (notamment les diarrhées causées par *Clostridium difficile* (Goldenberg *et al.*, 2017; Hempel *et al.*, 2012; McFarland, 2006; Sazawal *et al.*, 2006)) et les diarrhées du voyageur (Sazawal *et al.*, 2006). Des résultats sur les allergies (Isolauri *et al.*, 2000), les infections respiratoires (Hao *et al.*, 2015; Vouloumanou *et al.*, 2009), les entérocolites nécrosantes (AlFaleh and Anabrees, 2014; Bin-Nun *et al.*, 2005), les septicémies néonatales (Panigrahi *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2016, p.) et les infections de pathogènes (Falagas *et al.*, 2007) font également partie des résultats les plus prometteurs.

En raison de difficultés liées aux coûts, aux questions éthiques et aux questions de faisabilité, la majorité du travail de recherche sur la caractérisation des mécanismes responsables de l'activité des probiotiques est réalisé *in vitro* (sur des modèles cellulaires) ou *in vivo* (sur des modèles animaux). Bien que ces modèles présentent de nombreux avantages, les résultats obtenus doivent être interprétés avec précaution et doivent être validés dans le cadre d'essais cliniques, lorsque cela est possible. En effet, les nombreuses différences entre l'Homme et l'animal, en particulier les différences physiologiques et les différences de composition du microbiote, contribuent à expliquer le fait que certains résultats obtenus chez l'animal ne sont pas reproduits lors d'essais cliniques.

Les effets bénéfiques des probiotiques sont attribués à divers mécanismes tels que l'immunomodulation, la protection contre les agents pathogènes, la production de métabolites et d'enzymes bénéfiques, le renforcement de la fonction barrière de l'épithélium ou encore la modulation du microbiote du TGI (Fig. 16).

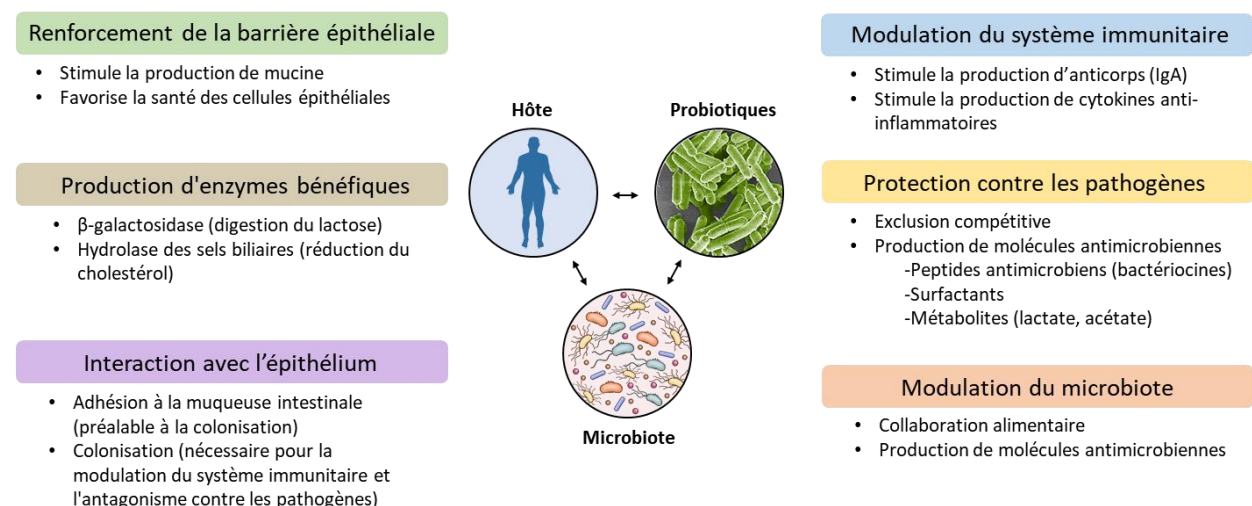


Fig. 16 Principaux mécanismes d'action des probiotiques. Il existe une influence réciproque entre l'hôte, son microbiote et les probiotiques. Adaptée de Sanders M-E *et al.*, 2019 et Bermudez-Brito M., 2012.

Les différents mécanismes d'actions présentés figure 16 sont très étudiés dans la littérature et font l'objet de nombreuses revues de qualité (Bermudez-Brito *et al.*, 2012; Halloran and Underwood, 2019; Sanders *et al.*, 2019). Dans le cadre de ce travail, nous allons aborder en particulier l'activité immunomodulatrice et le rôle antimicrobien des lactobacilles.

### 3.1.2 Lactobacilles et modulation de la réponse immunitaire

#### 3.1.2.1 Généralités sur le microbiote et le système immunitaire du tractus gastro-intestinal

Le microbiote humain désigne l'ensemble des micro-organismes qui vivent naturellement dans ou sur le corps humain. On distingue le microbiote de la peau, du tractus gastro-intestinal (TGI), de la bouche, du vagin, etc. (Fig. 17) ("Microbiota - MeSH - NCBI," 2022). Le microbiote du TGI est le plus important en termes de nombre avec un total estimé à près de  $10^{14}$  microorganismes (Mowat and Agace, 2014). Sa composition évolue fortement le long du TGI en raison des variations de pH, d'oxygénation, de disponibilité en nutriments, et des sécrétions de l'épithélium.

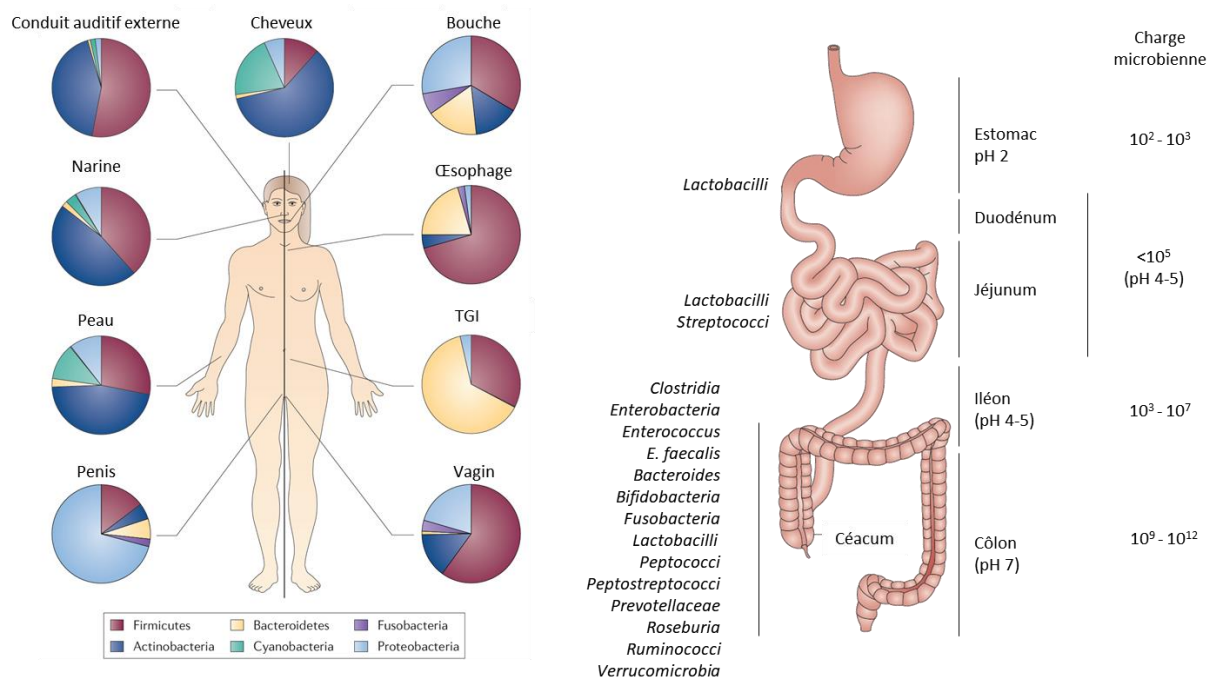


Fig. 17 Le microbiote humain. (A) Abondance relative des six *phyla* bactériens majoritaires composant la flore microbienne à différents endroits du corps d'un individu en bonne santé. (B) Composition de la flore microbienne le long du tractus gastro-intestinal (TGI). Le potentiel hydrogène (pH) le long du TGI est également indiqué. L'intestin grêle regroupe le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Le gros intestin regroupe le côlon et le rectum. Enfin l'intestin grêle et le gros intestin forment l'intestin. Adaptée de Spor A *et al.*, 2011 ; Tsabouri S *et al.*, 2014 et Allan M Mowat *et al.*, 2014.

Les microorganismes du microbiote sont constamment contrôlés par le système immunitaire de l'hôte afin de réguler leur croissance et de détecter d'éventuels pathogènes. C'est pourquoi, le système immunitaire associé au tractus intestinal, est le plus important en termes de nombre de cellules mobilisées pour la défense de l'organisme.

Le système immunitaire des mammifères correspond à l'ensemble des cellules et des molécules participant à la protection de l'organisme. Une de ses fonctions principales est la détection de

microorganismes pathogènes et l'organisation d'une réponse immunitaire permettant de les éliminer. Le système immunitaire est constitué de deux systèmes autonomes complémentaires possédant leurs propres cellules et molécules effectrices. On distingue le système immunitaire inné qui déclenche une réponse rapide et stéréotypée, mais qui est non spécifique ; et le système immunitaire adaptatif qui apporte une réponse lente, mais spécifique aux agents infectieux. Dans le tractus gastro-intestinal, la majorité des processus immunologiques se déroulent dans la muqueuse et fait intervenir les deux systèmes immunitaires (Fig. 18).

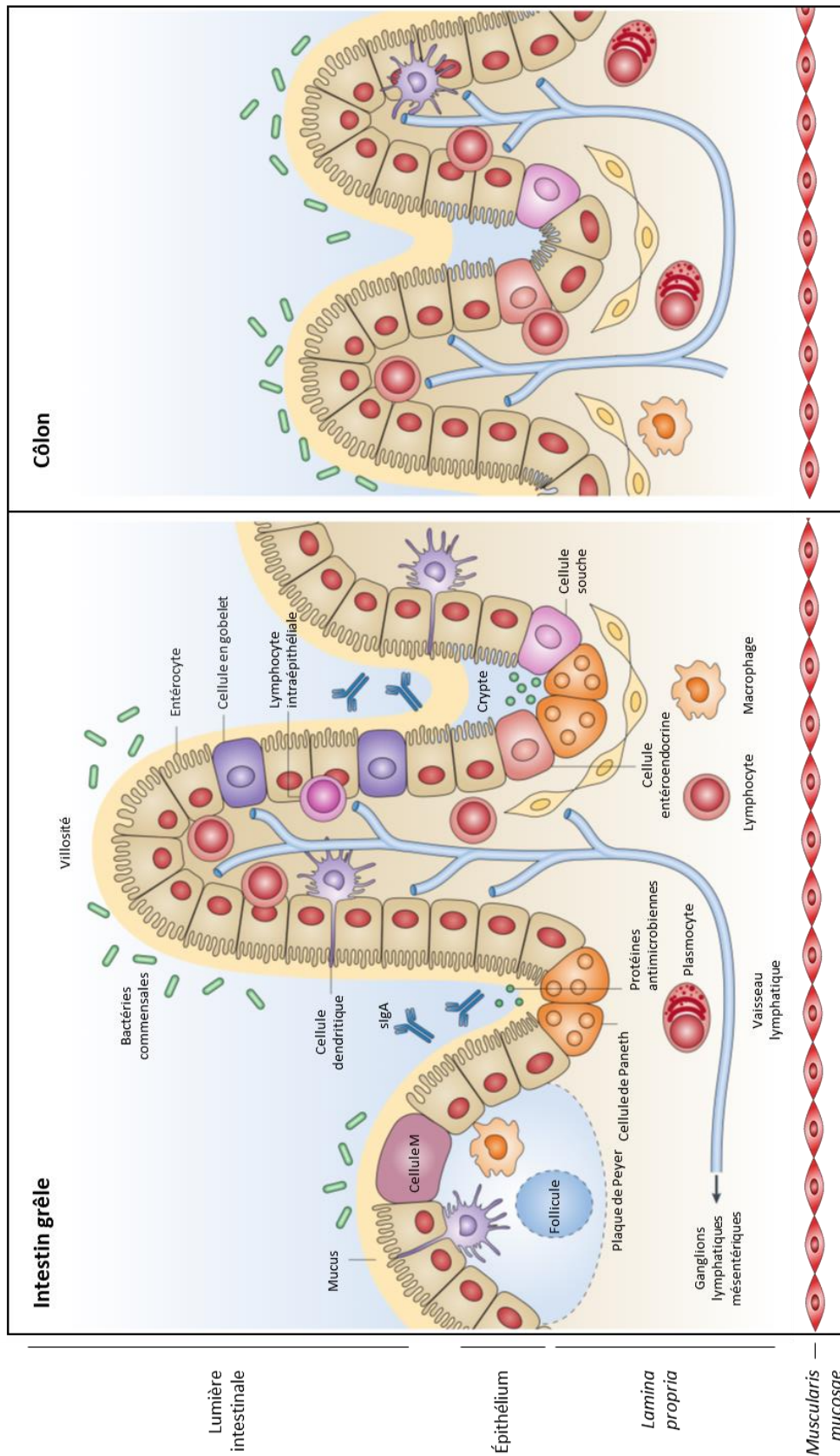


Fig. 18 Anatomie du système immunitaire intestinal. La muqueuse intestinale est constituée de l'épithélium, la lamina propria sous-jacente et d'une fine couche musculaire, appelée muscularis mucosa. Adaptée de Maria T. Abreu, 2010.



Le tractus gastro-intestinal est bordé par un épithélium composé de divers types cellulaires (Fig. 18). Les entérocytes sont les cellules majoritaires et représentent près de 90 % de l'épithélium. Ce sont des cellules polarisées qui jouent plusieurs rôles majeurs tels que l'absorption de nutriments, la synthèse du glycocalix (formant une couche protectrice à la surface des cellules), la synthèse d'enzymes digestives et le déclenchement de réponses immunitaires. En effet, les entérocytes expriment divers types de récepteurs de l'immunité innée appelés PRRs (Pathogen Recognition Receptors) qui reconnaissent des motifs associés aux pathogènes appelés PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns). L'activation des PRRs entraîne des cascades de signalisation permettant de monter une réponse immunitaire face aux menaces infectieuses. L'épithélium intestinal est également constitué d'autres types cellulaires jouant des rôles immunitaires importants, tels que les cellules M, les cellules de Paneth ou encore les cellules à gobelets (Fig. 18). Les cellules M sont spécialisées dans le transport d'antigènes (molécules du non-moi, capables d'activer la réponse immunitaire) depuis la lumière intestinale vers les cellules immunitaires sous-jacentes présentes au niveau des plaques de Peyer (Fig. 18). Par ce mécanisme, les plaques de Peyer jouent un rôle essentiel dans la reconnaissance et le déclenchement de la réponse immunitaire adaptative. Les cellules de Paneth, localisées dans les cryptes (à la base des villosités) sécrètent des protéines antimicrobiennes (AMPs) permettant de lutter contre les bactéries. Enfin, les cellules à gobelet produisent une épaisse couche de mucus jouant un rôle de barrière physique qui éloigne les microorganismes du microbiote. En plus des cellules épithéliales, de nombreuses cellules du système immunitaire inné et adaptatif sont également associées à l'épithélium ; en particulier des cellules dendritiques, des macrophages et divers types lymphocytes (Fig. 18).

Au niveau du tractus gastro-intestinal, le système immunitaire doit résoudre l'équation permettant d'assurer l'absorption des nutriments et de se protéger d'agents pathogènes, tout en tolérant la présence des microorganismes commensaux du microbiote. Le maintien de l'équilibre entre tolérance et réponse immunitaire au niveau des muqueuses du tractus gastro-intestinal est permis par un ensemble de régulations complexes qui ne sont pas encore entièrement comprises.

Le microbiote du TGI et l'hôte ont établi au cours d'une longue coévolution, une relation à bénéfices réciproques. L'hôte nourrit son microbiote et fournit un environnement protégé. En retour, le microbiote participe au métabolisme des carbohydrates, des lipides, des protéines (Bäckhed *et al.*, 2005; McConnell and Tannock, 1993). Il permet également la synthèse de vitamines (B, K) (Conly and Stein, 1992) et de diverses molécules aux propriétés bénéfiques (ex. acide linoléique conjugué (Devillard *et al.*, 2007), butyrate (Martín *et al.*, 2014)). De plus, le microbiote joue un rôle majeur dans le contrôle des infections et la régulation du système immunitaire (Jandhyala *et al.*, 2015). En effet, les bactéries commensales empêchent le développement des pathogènes par exclusion compétitive et produisent des molécules antimicrobiennes (Jandhyala *et al.*, 2015). Le microbiote permet également de maintenir le système immunitaire en alerte, stimulant la production de mucus, la sécrétion de peptides antimicrobiens et d'immunoglobulines A (IgA) (Belkaid and Harrison, 2017).

Il est important de remarquer que le microbiote et les bactéries bénéfiques qui le composent ont des modes d'action superposés à ceux attribués aux probiotiques (Fig. 16). Si bien que d'un point de vue mécanistique, il y a peu de distinction à faire entre les microorganismes probiotiques et les microorganismes bénéfiques présents naturellement dans le microbiote. La distinction réside dans le mode d'acquisition des microorganismes et leur capacité à coloniser le TGI. La présence des

microorganismes est naturelle dans le cas du microbiote alors qu'elle est liée à une consommation active d'aliments ou de suppléments alimentaires dans le cas des probiotiques.

### 3.1.2.2 Activités immunomodulatrices

De nombreux travaux menés sur la souris et sur des modèles cellulaires ont permis de mettre en évidence la capacité des bactéries probiotiques à interagir avec les cellules de l'hôte et à déclencher des réponses immunitaires. Les mécanismes mis en jeu sont nombreux et sont dépendants de l'espèce ou de la souche bactérienne étudiée.

Certaines souches de probiotiques sont capables de moduler des voies de signalisation clés des cellules épithéliales intestinales et des macrophages (Thomas and Versalovic, 2010). En particulier, l'activation des voies de signalisation de certains PRR appelés TLR (Toll-Like Receptor) est ciblée par certains probiotiques. Les TLR sont des récepteurs transmembranaires qui répondent principalement aux PAMPs. Ils sont exprimés par divers types cellulaires, dont les cellules épithéliales intestinales et les macrophages. Selon les voies de signalisation mobilisées, les probiotiques peuvent inhiber ou activer l'expression de gènes pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires (Fig. 19).

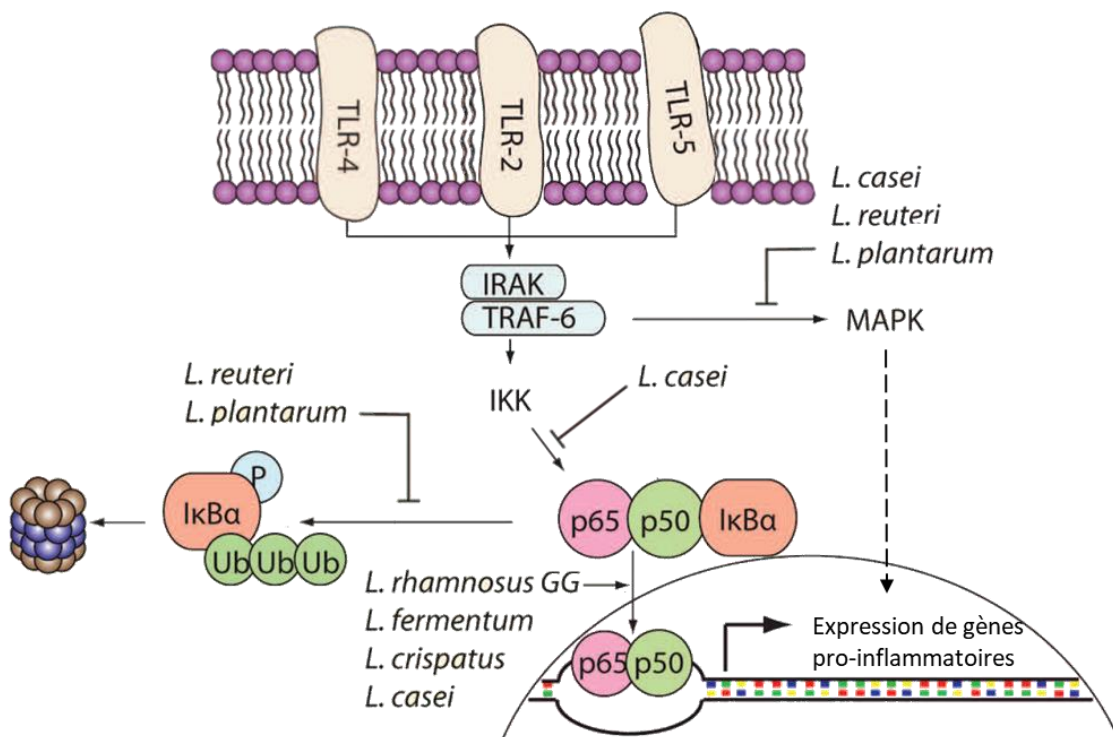


Fig. 19 Modulation des voies de signalisation inflammatoires de macrophages par les lactobacilles. Certaines souches de lactobacilles (ex. *L. casei*, *L. reuteri*, *L. plantarum*) empêchent l'activation de NFκB en diminuant la phosphorylation ou l'ubiquitination de IκBα (⊣ : inhibition). D'autres souches (ex. *L. rhamnosus* GG, *L. fermentum*, *L. crispatus*) favorisent la translocation de NFκB (p65-p50) dans le noyau nécessaire à son activité de facteur de transcription (→ : activation). La voie de signalisation des MAPKs est également modulée dans les macrophages par certains lactobacilles. IκBα, inhibiteur de NFκBα ; IKK, IκBα kinase ; IRAK, interleukin-1 receptor-associated kinase ; P, phosphorylation ; TLR, Toll-like receptor ; Ub, ubiquitine. Adaptée de Carissa M. Thomas *et al.*, 2010

La figure 19 illustre quelques stratégies mises en œuvre par divers lactobacilles pour moduler le profil inflammatoire des macrophages. Par exemple la souche *L. casei* Shirota inhibe le détachement de la protéine I $\kappa$ B $\alpha$  au facteur de transcription NF $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B), empêchant ainsi sa translocation dans le noyau et l'expression de gènes pro-inflammatoires (Watanabe *et al.*, 2009). De même, *L. reuteri* ATCC PTA 6475 (Iyer *et al.*, 2008) et *L. plantarum* K8 (H. G. Kim *et al.*, 2008b, 2008a) inhibent la dégradation de I $\kappa$ B $\alpha$  par le protéasome en prévenant son ubiquitinylation. D'autres souches inhibent la voie des MAPKs (Mitogen-activated protein kinases) impliquée dans l'expression de gènes pro-inflammatoires (H. G. Kim *et al.*, 2008b, 2008a; Kim *et al.*, 2006). À l'inverse, certaines souches de lactobacilles telles que *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 (Miettinen *et al.*, 2000), *L. casei* YIT 9029 (Matsuguchi *et al.*, 2003), *L. fermentum* YIT 0159 (Matsuguchi *et al.*, 2003) ou *L. crispatus* (Klebanoff *et al.*, 1999), stimulent la production de gènes pro-inflammatoires en favorisant la translocation de NF $\kappa$ B.

Plusieurs études ont montré que les probiotiques peuvent également stimuler la production d'IgA par des lymphocytes appelés plasmocytes au niveau des épithéliums (Fig. 18). Les IgA contribuent à la protection de l'hôte en neutralisant les microorganismes présents dans le TGI. Ce sont des molécules qui participent ainsi au contrôle du microbiote et permettent le maintien de l'équilibre homéostatique. Par exemple, une étude a rapporté que la consommation pendant 98 jours de lait fermenté contenant des lactobacilles (*L. casei* DN-114001, *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus*) avait entraîné une augmentation significative des IgA dans l'intestin grêle et le gros intestin de souris (de Moreno de LeBlanc *et al.*, 2008).

Certains lactobacilles orientent la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T régulateurs (Treg), en modulant l'activité des cellules dendritiques (CD). Les Treg sont des cellules régulatrices capables d'induire la tolérance aux bactéries commensales. Leurs activités sont également associées à la suppression de pathologies telles que les allergies ou l'asthme (Corthay, 2009).

Notamment, il a été montré que *L. acidophilus* W55 présente une forte capacité d'induction des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) en Treg. De même, la souche *L. paracasei* B21060 a été associée à l'inhibition de la production de cytokines inflammatoires par des CD et à la réduction de la différenciation de lymphocytes T naïfs en lymphocytes T effecteurs (pro-inflammatoires) (Mileti *et al.*, 2009).

Enfin, certaines molécules sécrétées par les bactéries probiotiques ont montré des activités immunomodulatrices *in vitro* et *in vivo*. Par exemple, la protéine p40 sécrétée par *L. rhamnosus* GG réduit l'apoptose des cellules épithéliales et favorise la protection de l'épithélium contre les lésions intestinales et la colite aiguë induites par le traitement de souris avec du dextran sodium sulfate (DSS) (Yan *et al.*, 2011). De plus, il a été montré que la sécrétion de la protéase Lactocepine par *L. paracasei* dégrade certaines chimiokines pro-inflammatoires (telles que CXCL10), et permet ainsi d'inhiber le recrutement de cellules inflammatoires dans les muqueuses de souris traitées avec du DSS (von Schillde *et al.*, 2012). Il existe de nombreux autres exemples de produits sécrétés aux propriétés immunomodulatrices tels que des protéines de surfaces (Konstantinov *et al.*, 2008), des acides téichoïques (TA)(Grangette *et al.*, 2005) et lipotéichoïques (LTA) (Mohamadzadeh *et al.*, 2011), du peptidoglycane (Macho Fernandez *et al.*, 2011), des exopolysaccharides (Lebeer *et al.*, 2011) ou encore des pili (Lebeer *et al.*, 2012).

### 3.1.3 Rôle antimicrobien des lactobacilles

Divers lactobacilles sont connus pour leurs activités antimicrobiennes contre de nombreuses bactéries pathogènes telles que *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Helicobacter pylori* ou *Staphylococcus aureus* (Hong *et al.*, 2018; Karska-Wysocki *et al.*, 2010; Todoriki *et al.*, 2001). Les mécanismes mis en jeu regroupent un ensemble de stratégies non exclusives qui dépendent de l'environnement et des souches probiotiques utilisées. On peut distinguer les mécanismes d'inhibition directs tels que la production d'antimicrobiens, des mécanismes indirects comme la stimulation des défenses de l'hôte ou la compétition pour l'accès aux ressources. Notamment, l'exclusion des pathogènes par compétition peut impliquer des facteurs tels la rapidité de multiplication, l'accès aux ressources (espace, nutriments) et la rapidité de leurs exploitations.

La production de molécules antimicrobiennes est un mécanisme important dans le rôle des probiotiques. Les lactobacilles libèrent notamment des molécules organiques de faible poids moléculaire issues du métabolisme (ex. lactate, acétate, formate, reuterine) ou des macromolécules antimicrobiennes (ex. bactériocines). Le lactate présente l'activité antimicrobienne la plus élevée. Son accumulation lors de la fermentation des carbohydrates entraîne une diminution du pH responsable d'un fort effet inhibiteur, en particulier sur les bactéries à Gram négatif (De Keersmaecker *et al.*, 2006; Makras *et al.*, 2006).

De plus, divers lactobacilles (ex. *L. reuteri*, *L. brevis*, *L. buchneri*) sont également capables de synthétiser un composé antimicrobien dérivé du glycérol, appelé reuterine. Ce métabolite présente une activité inhibitrice sur un large spectre de pathogènes dont les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, les champignons, les protozoaires et les virus (Schütz and Radler, 1984). Le mécanisme d'action de la reuterine n'est pas bien caractérisé à ce jour. Toutefois, il a été montré chez *Escherichia coli* que la reuterine entraîne la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), toxique pour la bactérie (Schaefer *et al.*, 2010).

De nombreux lactobacilles produisent également des peptides antimicrobiens appelés bactériocines. Nous pouvons notamment citer la lactacin B de *L. acidophilus* (Barefoot and Klaenhammer, 1983), la lactocin S de *L. sakei* (Gilmore *et al.*, 1996) ou encore la plantaricin W de *L. plantarum* (Holo *et al.*, 2001). Ces peptides sont synthétisés par des souches spécifiques et ont une activité létale sur un spectre plus ou moins grand de microorganismes. Par exemple, il a été montré que les bactériocines secrétées par *L. salivarius* sont capables de protéger des souris de l'infection à *Listeria monocytogenes* (Corr *et al.*, 2007, p. 1).

Des travaux ont montré que certains lactobacilles empêchent l'adhésion de pathogènes aux cellules épithéliales de l'hôte. Les mécanismes d'inhibition mis en jeu impliquent notamment la compétition pour l'attachement aux cellules ou encore la stimulation des défenses de l'hôte. Par exemple, des travaux obtenus chez la souris suggèrent que l'attachement de *L. acidophilus* LAP5 ou *L. fermentum* LF33 aux muqueuses permet de réduire la colonisation du TGI par *S. Typhimurium* (Tsai *et al.*, 2005). Par ailleurs, il a été montré que certaines souches sont capables de stimuler la production de mucine et d'empêcher l'attachement de pathogènes. Notamment, l'induction de MUC3 ou MUC2 par certaines souches de *L. acidophilus* réduit l'attachement d'*Escherichia coli* pathogènes aux cellules épithéliales de l'hôte (Y. Kim *et al.*, 2008; Mack *et al.*, 2003).

La compétition pour l'accès à certaines ressources limitantes est permanente dans le microbiote. Le fer est un élément nécessaire à la croissance et au développement de la majorité des organismes

vivants. De nombreuses bactéries pathogènes ont développé des stratégies pour l'acquisition du fer telles que la sécrétion de chélateurs (sidérophores) afin de capturer le fer présent dans la lumière du TGI (Yilmaz and Li, 2018). Les lactobacilles n'ont quant à eux pas besoin de fer pour se développer (Elli *et al.*, 2000; Parmanand *et al.*, 2019). Cette caractéristique constitue un avantage majeur pour la compétition dans le TGI où le fer est l'un des facteurs limitants les plus importants. De plus, il a été montré que certains lactobacilles tels que *L. acidophilus* et *L. delbrueckii* sont capables de lier les hydroxydes ferriques à leur surface, les rendant ainsi indisponibles pour les microorganismes pathogènes (Elli *et al.*, 2000).

### 3.2 Rôles des *Lactobacillaceae* contre les biofilms de pathogènes

#### 3.2.1 Les biofilms bactériens

##### 3.2.1.1 Définition

Les biofilms sont des communautés agrégées de microorganismes dans lesquelles les cellules sont intégrées dans une matrice autoproduite de substances polymériques extracellulaires (EPS), permettant leur adhésion les unes aux autres et/ou à une interface (Flemming *et al.*, 2021, 2016). Le biofilm est le mode de vie majoritaire des microorganismes dans l'environnement. On estime que près de 40 à 80 % des microorganismes sur terre résident dans un biofilm (Flemming and Wuertz, 2019). Ainsi, les biofilms sont virtuellement présents dans tous les habitats, notamment les océans, les nappes phréatiques, les canalisations, les animaux ou encore les plantes (Flemming and Wuertz, 2019).

La matrice d'EPS sécrétée par les microorganismes est constituée de polysaccharides, de protéines, d'acides nucléiques et des lipides qui forment un ensemble structuré plus ou moins rigide dans lequel les cellules sont immobilisées. Le réseau tridimensionnel formé par la matrice assure notamment la stabilité mécanique, la cohésion et l'adhésion du biofilm aux surfaces. De plus, on attribue à la matrice divers rôles tels que la capture et la rétention d'eau et de nutriments, la digestion de macromolécules ou encore le transfert de matériel génétique (Flemming and Wingender, 2010).

Au sein des biofilms, les microorganismes présentent un ensemble de propriétés dites « émergentes » distinctes des cellules planctoniques isolées, en raison des caractéristiques spécifiques liées à ce mode de vie. En effet, la protection apportée par la matrice et la proximité entre les cellules participent à la création de microenvironnements au sein du biofilm qui se manifeste par la formation de gradients (pH, oxygène dissous, potentiel redox, nutriments, molécules de communication) (Flemming *et al.*, 2016). Par ailleurs, une expression génique différentielle et des activités physiologiques spécifiques ont été décrites dans l'ensemble du biofilm en réponse aux conditions micro-environnementales locales (Flemming *et al.*, 2016).

Une des conséquences majeures du biofilm est la tolérance accrue à divers stress tels que l'exposition aux UV, l'acidité, la déshydratation, les variations d'osmolarité, le système immunitaire ou encore le traitement aux ATBs (antibiotiques) et autres antimicrobiens (tels que les désinfectants). Il a notamment été rapporté que les bactéries présentes dans les biofilms peuvent être jusqu'à 1000 fois plus résistantes aux ATBs que lorsqu'elles se trouvent sous forme planctonique (Costerton *et al.*, 1999). Ces résistances accrues peuvent notamment s'expliquer par la faible pénétration de certains ATBs dans la matrice d'EPS (Anderl *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2010), la protection apportée par les cellules avoisinantes (effet de « bouclier », accumulation d'enzymes de dégradation des ATBs), la surexpression de gènes de résistance (codant pour des pompes à efflux, des enzymes de dégradation) (Alav *et al.*, 2018), ainsi que par l'hétérogénéité métabolique des microorganismes favorisant la tolérance (Bernier *et al.*, 2013). En effet, au sein des biofilms, une minorité de bactéries

dités persistantes (moins de 1 % de la population) présentent de manière transitoire et non héritable un métabolisme ralenti (ou dormant) qui leur confère une forte tolérance aux stress antimicrobiens (Lewis, 2007). Enfin, l'exposition à des concentrations subinhibitrices d'ATBs et la facilité des transferts horizontaux de gènes au sein des biofilms contribuent fortement à l'émergence de résistances (Abe *et al.*, 2020).

### 3.2.1.2 La formation des biofilms

La formation du biofilm se déroule en 5 étapes principales. Elle débute par l'attachement de cellules à une surface, la division des cellules et de la sécrétion de substances polymériques extracellulaires (EPS), la formation de microcolonies, la maturation du biofilm et enfin la dispersion des bactéries (Costerton *et al.*, 1999) (Fig. 20). Ces étapes sont orchestrées par un ensemble de régulations cellulaires intégrant les conditions environnementales à l'échelle locale et à l'échelle de la communauté microbienne *via* la communication par des molécules de signalisation appelées molécules du *quorum sensing* (QS).

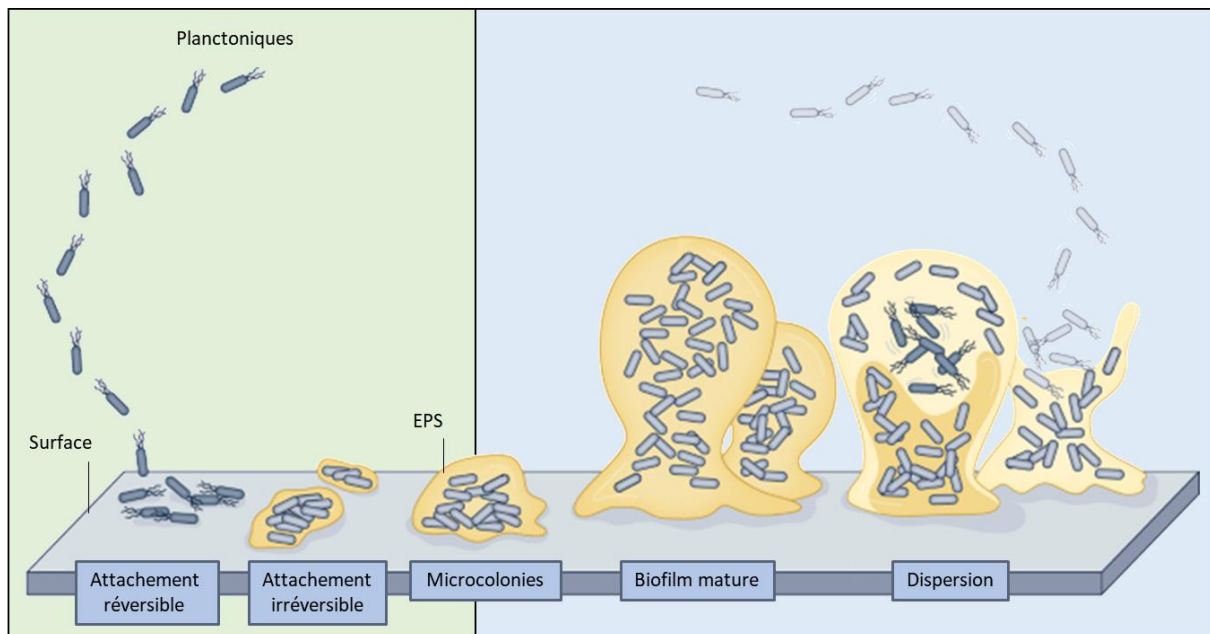


Fig. 20 Schéma illustrant les 5 étapes clés de la formation d'un biofilm bactérien. La zone verte correspond aux étapes ciblées par les stratégies visant à prévenir la formation du biofilm et la zone bleue celles visant à éliminer les biofilms déjà établis. Adaptée de Karin Sauer *et al.*, 2022 et Lebeaux *et al.*, 2014.

L'attachement des bactéries à une interface est tout d'abord réversible et met en jeu des mécanismes d'interactions physico-chimiques de faibles intensités tels que des interactions électrostatiques, des forces de Van der Waals et des forces hydrophobes acide-base de Lewis (Bos *et al.*, 1999). Lorsque les bactéries sont suffisamment proches du support, leurs appendices de surface tels que les pili, les flagelles, les adhésines ou les curli sont également mis en jeu dans ces 1<sup>res</sup> interactions avec le support (Berne *et al.*, 2018). Ensuite, un attachement plus fort qualifié « d'irréversible » s'effectue par augmentation de la surface de contact entre la bactérie et le support. Ces interactions impliquent des protéines et des polymères présents à la surface des bactéries (Berne *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2012).

L'adhésion irréversible est suivie par la multiplication des bactéries à la surface du support et la sécrétion d'EPS permettant la formation d'une microcolonie. À mesure que les bactéries se multiplient au sein des microcolonies, l'accumulation de cellules provoque une augmentation d'épaisseur conduisant à la transition d'une monocouche bidimensionnelle à une structure tridimensionnelle stabilisée par la matrice d'EPS (Su *et al.*, 2012).

Une fois la microcolonie établie, la prolifération des bactéries et la synthèse d'EPS se poursuivent jusqu'à former un biofilm mature dans lequel des interactions et des régulations complexes sont établies. L'épaisseur et la morphologie du biofilm dépendent de la composition microbienne du biofilm, de la nature du support, de « l'âge » du biofilm, et des conditions environnementales (ressources, stress).

Les bactéries sont soumises à une forte hétérogénéité environnementale au sein des biofilms matures en raison de la formation de divers gradients depuis le centre vers les couches les plus externes (pH, oxygène dissous, potentiel redox, nutriments, molécules de communication). Selon la position des microorganismes au sein du biofilm, l'accès aux ressources et l'exposition aux stress sont plus ou moins importants. Par exemple, les bactéries présentes au cœur du biofilm ont une activité métabolique réduite contribuant à la plus grande capacité de résistance aux ATBs (Walters *et al.*, 2003).

Enfin, la dispersion de bactéries issues des biofilms matures implique des processus passifs dus à des contraintes physiques s'exerçant sur le biofilm ainsi que des processus régulés intégrant les variations environnementales (oxygène, températures, nutriments, etc.) (Kaplan and Fine, 2002; Petrova and Sauer, 2016; Sauer *et al.*, 2004; Thormann *et al.*, 2005).

Divers mécanismes actifs ont été identifiés dans la littérature. Notamment, l'accumulation de stress au sein du biofilm (privation de nutriment, hypoxie, pH) entraîne la mort de certaines bactéries et conduit à la formation de cavités (Ma *et al.*, 2009). De plus, certaines bactéries libèrent des molécules déstructurant le biofilm, telles que des enzymes capables de digérer la matrice (Boles and Horswill, 2008; Kaplan *et al.*, 2004, 2003) ou encore des surfactants (Boles *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2011).

Une fois dispersées, les bactéries peuvent adopter un mode de vie planctonique ou démarrer la formation d'un nouveau biofilm (Fig. 20).

### 3.2.1.3 Biofilm de *Salmonella enterica*

#### **Les bactéries de l'espèce *S. enterica***

*Salmonella enterica* regroupe un ensemble de bactéries entériques capables d'infecter l'Homme et l'animal (Harrell *et al.*, 2020). L'espèce *S. enterica* est divisée en six sous-espèces dont *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *indica* ainsi que la sous-espèce *enterica* responsable de plus de 99 % des salmonelloses chez l'Homme (Lamas *et al.*, 2018). En raison de son importance sanitaire, le groupe *S. enterica* subsp *enterica* est le plus largement étudié. Il contient plus de 1500 sérotypes, dont les sérotypes Typhimurium et Enteritidis qui sont les principaux responsables des gastroentérites à résolution spontanée (Lamas *et al.*, 2018). Chaque année, on estime que les infections à salmonelles entraînent plus de 90 millions de gastroentérites dans le monde et près de 150 000 décès (Majowicz *et al.*, 2010). Les sources de contaminations principales sont les produits alimentaires d'origine animale tels que la volaille, les œufs ou encore les produits laitiers (Tableau 5). Les transmissions interhumaines ainsi que les contacts avec des animaux domestiques sont également une source importante d'infection (Harrell *et al.*, 2020).

La capacité à former un biofilm est un caractère partagé par de nombreux sérotypes de *S. enterica*. Il permet la survie dans l'environnement, facilite la transmission, favorise la colonisation et favorise la persistance des bactéries dans les organismes hôtes (Fàbrega and Vila, 2013).

La composition et les mécanismes de régulation du biofilm de *S. enterica* ont majoritairement été étudiés chez le sérotype Typhimurium. Toutefois, de fortes similarités ont été identifiées chez de nombreux autres sérotypes de la sous-espèce *enterica* ainsi que chez de nombreuses autres bactéries entériques (Doran et al., 1993; Römling et al., 1998; Zogaj et al., 2003).

#### **Composants principaux de la matrice du biofilm de *S. Typhimurium***

La matrice des biofilms de *S. Typhimurium* est principalement composée de protéines et d'exopolysaccharides. Ces biofilms se caractérisent par la formation du morphotype rdar (red, dry, rough sur boîte d'agar supplémentée de rouge Congo) qui indique la présence de curlis (*fimbriae*) et de cellulose dans la matrice (Simm et al., 2014). Les curlis sont les composants majoritaires de la matrice et sont impliqués dans l'adhésion des bactéries aux surfaces, dans l'agrégation cellulaire et dans la formation de biofilm (Barnhart and Chapman, 2006). D'autres composants protéiques sont également présents tels que des *fimbriae* de type I (ex. Lpf, Pef) (Ledebøer et al., 2006; Wagner and Hensel, 2011), des protéines Bap (Biofilm-Associated Proteins) (Latasa et al., 2005) ou encore des flagelles (Römling and Rohde, 1999). Ensuite, la cellulose est le deuxième composant le plus abondant de la matrice. Ce polysaccharide est impliqué dans les étapes d'attachement, dans la formation des microcolonies et dans l'organisation tridimensionnelle du biofilm (Zogaj et al., 2001, 2003). D'autres exopolysaccharides sont sécrétés dans la matrice, notamment de l'acide colanique (Ledebøer and Jones, 2005) et des fragments de capsule (Gibson et al., 2006). Enfin, de l'ADN extracellulaire et des acides gras ont également pu être détectés dans une moindre mesure (Gibson et al., 2006; Wang et al., 2014).

#### **Éléments majeurs de la régulation du biofilm de *S. enterica***

La formation du biofilm de *S. Typhimurium* est contrôlée par le régulateur transcriptionnel CsgD. Ce régulateur qualifié de « clé de voute » active l'expression des curlis, des Bap et active la biosynthèse de cellulose (Gerstel and Römling, 2003). La concentration de CsgD est finement contrôlée par un ensemble de régulations transcriptionnelles, post-transcriptionnelles, traductionnelles et post-traductionnelles en réponse à une multitude de signaux environnementaux (nutriments, température, tension d'oxygène, osmolarité, pH, éthanol) (Gerstel and Römling, 2003). En particulier, le di-GMP cyclique (Di-guanosine monophosphate cyclique) est une molécule de signalisation majeure, connue pour activer l'expression du gène *csgD* et inhiber la motilité bactérienne (Simm et al., 2014). De plus, il a également été montré que des petits ARN (ex. McaS, RprA, OmrA/B) régulent l'expression de CsgD en inhibant la traduction et en induisant la dégradation des ARN messager (Mika and Hengge, 2013). De manière intéressante, l'activité enzymatique d'hydrolases du peptidoglycane (les transglycosylases MltE et MltC) a été impliquée dans la modulation de *csgD* (Monteiro et al., 2011). Toutefois, les mécanismes mis en jeu dans cette régulation du biofilm restent encore à élucider.

### **3.2.1.4 Les impacts des biofilms bactériens**

#### **Impacts sur la santé**

Les biofilms constituent un challenge majeur dans le monde médical où l'on estime qu'ils sont associés à près de 65 à 80 % des infections chez l'Homme ("NIH Guide: RESEARCH ON MICROBIAL BIOFILMS," 2022; Potera, 1999).



Au sein des établissements hospitaliers, la présence de biofilms sur les surfaces représente une source majeure de contamination favorisant les infections nosocomiales. Leur développement sur des dispositifs médicaux et les tissus humains entraînent des infections fréquemment associées à des échecs thérapeutiques en raison de leurs résistances accrues aux traitements ATBs et de leur capacité à contourner les défenses immunitaires de l'hôte (Fig. 21) (González *et al.*, 2018).

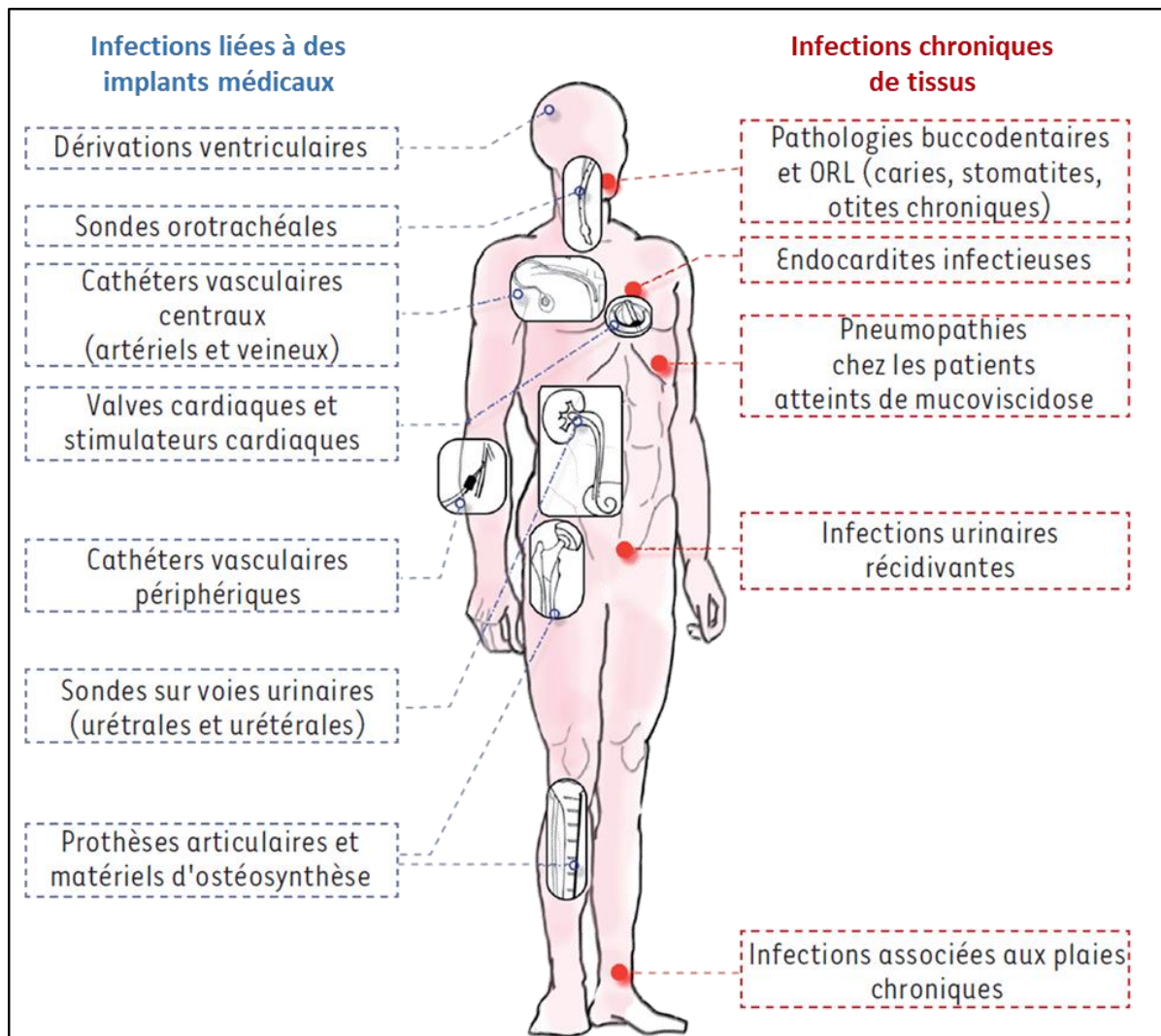


Fig. 21 Exemples d'infections chez l'Homme liées à la formation de biofilms de pathogènes. Adaptée de David Lebeaux *et al.*, 2012 et 2014.

Dans les tissus, le développement de biofilms est associé à diverses infections telles que des infections urinaires, des otites chroniques, des caries, des endocardites (Vestby *et al.*, 2020). Les biofilms sont notamment présents dans plus de 90 % des plaies chroniques et leur éradication implique la mise en œuvre de stratégies thérapeutiques adaptées à chaque biofilm (Attinger and Wolcott, 2012).

Par ailleurs, tous les dispositifs médicaux implantés sont sujets au développement de biofilms de pathogènes tels que les sondes, les cathéters, les prothèses, ou encore les valves et stimulateurs cardiaques (Lebeaux and Ghigo, 2012).

Plus largement, la formation de biofilms dans les équipements et infrastructures en contact avec de l'eau tels que les réservoirs ou les systèmes de distribution d'eau destinés à la consommation constitue

un risque majeur pour la santé. En effet, les biofilms peuvent abriter diverses bactéries pathogènes responsables d'infections ou d'intoxications (Flemming, 2002). Une étude menée dans plusieurs pays d'Europe a pu identifier des souches pathogènes d'*Escherichia coli* dans des biofilms prélevés sur divers réseaux de distribution (Juhna *et al.*, 2007).

### Impacts dans les industries agroalimentaires

Dans l'industrie agroalimentaire, le développement de biofilms sur les infrastructures, les équipements et les matrices alimentaires entraînent des pertes économiques importantes et représentent également un risque majeur pour la santé des consommateurs. Les biofilms sont impliqués dans la dégradation des équipements (corrosion, encrassement), l'altération des aliments et ils peuvent provoquer des épidémies d'intoxications ou d'infections alimentaires potentiellement mortelles (Flemming, 2002; Srey *et al.*, 2013). L'OMS estime que chaque année dans le monde, près de 600 millions d'individus tombent malades après avoir consommé des aliments contaminés et 420 000 en meurent ("Food safety," 2022). Toujours selon l'OMS, la contamination des aliments peut survenir à chacune des étapes de la chaîne de production ainsi que lors de la livraison et la consommation des aliments ("Foodborne diseases," 2022).

En particulier, de nombreuses bactéries pathogènes sont capables de former des biofilms dans les usines agroalimentaires et de contaminer les aliments. Parmi les pathogènes les plus couramment associés aux infections d'origines alimentaires, on trouve *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC), *Listeria monocytogenes*, *Vibrio spp.*, *Salmonella spp.* ou encore *Campylobacter jejuni*. Selon les souches bactériennes impliquées, les infections peuvent avoir des conséquences bénignes (diarrhées, nausées, vomissements) ou plus graves, voire mortelles (septicémies, méningites, syndrome hémolytiques et urémiques) (Tableau 5).

Tableau 5 Principales bactéries pathogènes responsables d'infections alimentaires. Adaptée des fact-sheets de l'OMS 2022 / <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>.

Pathogène	Enveloppe	Sources d'infections alimentaires	Symptômes
<i>Escherichia coli</i> producteurs de Shiga-toxines	Diderme	Produits laitiers non pasteurisés, viandes crues, fruits et légumes	Diarrhées non sanglantes, colite hémorragique, syndrome hémolytique et urémique (SHU)
<i>Salmonella enterica</i>	Diderme	Volailles, œufs, viandes, aliments prêts à consommer, légumes.	Fièvre, maux de tête, nausées, vomissements, douleurs abdominales, diarrhées
<i>Campylobacter jejuni</i>	Diderme	Lait cru, volailles, viandes crues, eau, aliments prêts à consommer.	Diarrhées, douleurs abdominales, selles sanguinolentes, fièvre, nausées et vomissements
<i>Vibrio spp.</i>	Diderme	Eau, poissons, fruits de mer, riz, légumes.	Douleurs abdominales, vomissements, diarrhées aqueuses abondantes
<i>Listeria monocytogenes</i>	Monoderme	Produits laitiers non pasteurisés, aliments prêts à consommer, poissons, fruits de mer, fruits et légumes	Diarrhées, fièvres, maux de tête, nausées, douleurs musculaires, septicémie, méningite, infections du fœtus

N. B. Les aliments et les symptômes les plus fréquemment associés à l'infection par les pathogènes sont précisés.

Les biofilms peuvent se développer sur un ensemble de surfaces fréquemment présentes dans les usines telles que l'acier inoxydable, le bois, le verre, le caoutchouc, etc. On les trouve donc dans les canalisations, la surface des tables, les tuyaux de distribution, les gants du personnel, le matériel d'emballage, les silos de stockage, les réservoirs, etc. (Colagiorgi *et al.*, 2017; Waak *et al.*, 2002).

Les aliments les plus susceptibles de subir des contaminations liées aux biofilms sont les produits laitiers (Sharma and Anand, 2002), les viandes (volailles, viandes de porc, viandes rouges) (Chia *et al.*, 2009), les poissons et les fruits de mer (Gram and Huss, 1996; Mizan *et al.*, 2015). Enfin, les aliments transformés prêts à la consommation sont des produits particulièrement à risque, en raison des diverses manipulations liées à la transformation des produits avant et après cuisson (Osaili *et al.*, 2011).

### **Impacts dans les industries non alimentaires**

La formation de biofilms pose également de nombreuses difficultés dans les industries non alimentaires. Ils engendrent des pertes économiques liées à la diminution voire à l'arrêt des exploitations. En particulier, les matériaux et les systèmes en contact avec l'eau peuvent être encrassés, corrodés ou bien même obstrués par l'accumulation du biofilm. Par exemple, les échangeurs de chaleur (chaudières, machines frigorifiques), les coques de navires, les filets de pêche, les canalisations, sont particulièrement impactés par le développement de biofilms (Flemming, 2002).

#### **3.2.1.5 Les modèles d'étude des biofilms**

En raison de leur importance écologique et des conséquences sanitaires et économiques engendrées par leur formation, les scientifiques ont développé au cours des 40 dernières années divers modèles de biofilms *in vitro* et *in vivo*. L'objectif de ces modèles est de reproduire tout ou une partie des caractéristiques associées au développement et au mode de vie des biofilms, afin d'étudier la formation et les propriétés « émergentes » des microorganismes qu'ils contiennent.

La pertinence des modèles choisis pour l'étude des biofilms dépend des questions biologiques de l'expérimentateur et prend en compte des critères tels que la nature des surfaces, le nombre de microorganismes (monocultures, communautés multi-espèces), l'accès aux nutriments, la présence de stress, etc. Par exemple, la présence de gradients, la densité cellulaire élevée et la production de matrices d'EPS sont des critères importants pour l'étude de biofilms matures. Par ailleurs, il faut préciser qu'il n'existe pas de modèles parfaits, mais des modèles qui permettent de répondre à des questions biologiques précises. Ainsi, bien que les biofilms mono-espèces ont permis à la communauté scientifique de comprendre de nombreux mécanismes fondamentaux mis en jeu dans la formation des biofilms, ce type de modèle ne reproduit pas entièrement les processus se déroulant dans la nature. En effet, les biofilms naturels sont majoritairement formés par des communautés de microorganismes et peuvent présenter des propriétés différentes des biofilms mono-espèces. Par exemple, la présence de multiples microorganismes peut faciliter la formation des biofilms. En effet, il a été montré que les biofilms mono-espèces de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Klebsiella pneumoniae* présentent une épaisseur plus faible (de 29 et 100  $\mu\text{m}$  respectivement) comparée à l'épaisseur moyenne formée par les biofilms mixtes (de 400  $\mu\text{m}$ ) (Murga *et al.*, 1995). De plus, la diversité au sein des biofilms contribue également à augmenter la résistance aux stress des bactéries vis à vis des traitements par les ATBs et des désinfectants (Giaouris *et al.*, 2015).

### **Les modèles *in vitro***

Une grande partie des connaissances acquises sur les biofilms sont issues d'expériences sur des modèles *in vitro*.

Parmi les modèles de biofilm *in vitro*, les modèles dits « ouverts » reposent sur le principe des cultures continues. Ces modèles sont caractérisés par le renouvellement continu du milieu de culture conduisant ainsi à l'élimination des déchets et des cellules mortes ou non adhérentes (ex. systèmes à flux de déplacement, dispositifs microfluidiques, etc.) (Coenye and Nelis, 2010). Les modèles « ouverts » offrent l'avantage de pouvoir contrôler plusieurs paramètres de l'expérience (vitesse d'écoulement, température, composition du milieu au cours du temps) et permettent ainsi d'étudier la résistance physique et chimique des biofilms. Ces modèles sont néanmoins peu adaptés à des analyses à haut débit en raison du coût et des équipements nécessaires pour mener les expérimentations.

Les modèles de biofilm *in vitro* dits « fermés » correspondent à des modèles où les conditions d'accès aux nutriments sont limitées (ex. culture en plaque de gélose, en plaque multipuits, dispositif de Calgary) (McBain, 2009). Contrairement aux modèles « ouverts », les microorganismes se développent jusqu'à épuisement des ressources présentes dans le milieu de culture ; les déchets et les cellules mortes s'accumulent également dans le milieu de culture. C'est pourquoi les modèles de biofilms « fermés » sont plus adaptés à l'étude des étapes précoces de la formation des biofilms. Ces modèles offrent de nombreux avantages ; ils sont bon marché, faciles à réaliser et permettent de mener des analyses à haut débit (cribles génétiques). Ils permettent également une quantification rapide des cellules viables présentes dans le biofilm (test de réduction XTT) ou encore une quantification de la biomasse formée (par coloration au cristal violet, safranine, rouge congo).

Le système en plaques multipuits fait partie des modèles de biofilm les plus utilisés en raison de la facilité de mise en œuvre et de son potentiel pour les analyses à haut débit (Djordjevic *et al.*, 2002). De plus, ce système requiert peu de volume de culture (100-200 µL) ce qui peut être un atout majeur lorsque le matériel biologique est limitant. Dans le système de culture en plaque multipuits (polystyrène, polypropylène ou polycarbonate), le milieu de culture contenu dans les micropuits est d'abord inoculé par des microorganismes. Puis, les plaques sont incubées en aérobie ou anaérobie, avec ou sans agitation pendant la durée définie par l'expérimentateur. Enfin, les microorganismes morts ou non-adhérents sont éliminés par une série de lavages, puis les microorganismes adhérents aux surfaces sont quantifiés par coloration (cristal violet).

### **Les modèles *in vivo***

Les limites des modèles *in vitro*, en particulier leurs incapacités à reproduire les conditions de vie au sein de l'hôte ont conduit au développement de multiples modèles *in vivo* utilisant des animaux mammifères (majoritairement rongeurs) ou non-mammifères (tels que la mouche du vinaigre *Drosophila melanogaster*, le poisson-zèbre *Danio rerio*, le nématode *Caenorhabditis elegans*). Dans une moindre mesure, les modèles de biofilms *ex vivo* sur des prélèvements de tissus ou organes sont également utilisés (Coenye and Nelis, 2010).

Ces modèles permettent notamment l'étude des infections liées aux biofilms dans les tissus ou l'étude des infections associées à l'implant d'appareils médicaux. Ces modèles sont particulièrement pertinents dans le cadre de l'étude des rôles des biofilms dans les échecs thérapeutiques.

### 3.2.1.6 Les stratégies d'élimination des biofilms bactériens

Afin de traiter les biofilms, diverses stratégies de contrôle sont mises en œuvre dans les industries et le monde médical. On distingue les approches visant à éliminer les biofilms établis, des approches visant à prévenir la formation des biofilms (Tableau 6). Les approches d'élimination du biofilm sont privilégiées sur des biofilms matures et en cours de maturation (Fig. 20 ; zone bleue), alors que les approches préventives ciblent quant à elles les étapes précoces de la formation du biofilm telles que l'attachement, la communication ou la synthèse de matrice (Fig. 20 ; zone verte).

Tableau 6 Stratégies de lutte contre la formation des biofilms négatifs.

Stratégies antibiofilms	Type de traitement	Mode d'action	Exemples de composés ou de méthodes (non exhaustif)	Références	
Éliminer les biofilms établis	Désinfectants	Bactéricide	Hypochlorite de sodium (NaClO)	PMID: 9257443	
			Acide peracétique	PMID: 10419269	
			Peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	PMID: 15771172	
	Traitements physiques	Décrochement mécanique	Ozone	PMID: 15771172	
			Bactéricide	Ultrasons	PMID: 10728560
				Nettoyage manuel	PMID: 16216371
			Ultraviolets	PMID: 22214077	
	Enzymes	Dispersion (Dégradation de la matrice)	Température	PMID: 28434696	
			Alpha-amylase (glycosidase)	PMID: 21760865	
			Dispersine B (glycosidase)	PMID: 12896987	
			Protéinase K (protéase)	PMID: 17221196	
			Trypsine (protéase)	PMID: 17221197	
	Molécules anti-QS	Dispersion	DNase	PMID: 19064900	
Peptide auto-inducteur RIP			PMID: 18437240		
Peptides antimicrobiens et antibiotiques	Bactéricide	Nisine A	PMID: 28457635;		
		Lacticine Q	PMID: 23979748		
Chélateurs	Bactéricide	Ofloxacin	PMID: 23979748		
		EDTA	PMID: 9084923		
Bactériophages	Bactéricide	Bacteriophage T4	PMID: 26155384;		
			PMID: 16517655		
Prévenir la formation des biofilms	Surfactants	Dispersion / bactéricide		PMID: 7728652	
			Rhamnolipide	PMID: 28822551	
	Traitement des surfaces (Revêtement)	Bactéricide (Peptides antimicrobiens et antibiotiques)	Surfactant	PMID: 26505130	
			Rhamnolipide	PMID: 28065676	
			Vancomycine	PMID: 16936926	
			Nisine A	PMID: 25499501	
			Argent (Ag)	PMID: 31767527	
			Dioxyde de titane (TiO <sub>2</sub> ) galabiose	PMID: 23434154	
	Chélateurs	Empêche la formation de la matrice	galabiose	PMID: 17623698	
			Lactoferrine	PMID: 21377840	
	Composés naturels ou synthétiques	Modulation des signaux cellulaires	EDTA	PMID: 18594291	
			Curlicues	PMID: 19915538	
	Molécules anti-QS	Affecte la motilité	Inhibiteurs de diguanylate cyclase	PMID: 22850508	
Hordenine			PMID: 29353476		
Furanones			PMID: 24118802		
Bactériophages	Bactéricide	Lactonase	PMID: 21183649;		
		Cocktail de phages	PMID: 24951790		

N. B. On distingue les stratégies visant à éliminer les biofilms établis et celles visant à prévenir leur formation. QS: *quorum sensing*; EDTA: éthylènediaminetétraacétique.

### **Éliminer les biofilms établis**

Dans l'industrie, l'élimination des biofilms repose principalement sur l'utilisation de désinfectants et de traitements par la chaleur (ex. autoclavage, pasteurisation). Ces traitements sont économiques et permettent de traiter de larges surfaces en agissant sur un large spectre de microorganismes. En particulier, les désinfectants sont très utilisés pour désinfecter le matériel et les équipements médicaux. Par exemple, les agents oxydants tels que peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ou l'acide peracétique (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 7 %, CH<sub>3</sub>COOH 40 %) sont les désinfectants les plus utilisés pour traiter les surfaces en raison de leurs effets bactéricides et de leur capacité à dégrader les matrices de biofilms (S. H. I. Lee *et al.*, 2016; Toté *et al.*, 2010; Penna *et al.*, 2001). De même, l'hypochlorite de sodium (NaClO) ou l'ozone sont des désinfectants aux propriétés antimicrobiennes et antibiofilms (Marino *et al.*, 2018; Osono *et al.*, 2021).

Les microorganismes présents au sein des biofilms peuvent présenter un certain degré de résistance aux désinfectants, c'est pourquoi de nouvelles stratégies de traitement se sont développées. Des traitements physiques (ex. ultrasons, lumière ultraviolette), l'utilisation d'enzymes, de bactériophages ou encore le brouillage des communications au sein des biofilms sont ainsi utilisés en compléments des approches chimiques plus conventionnelles (Tableau 6).

L'utilisation d'enzymes telles que des glycosidases, des protéases ou des DNase ont pour objectifs de déstructurer les biofilms en dégradant la matrice d'EPS et permettre ainsi un meilleur accès des désinfectants aux microorganismes (Tableau 6). Le plus souvent, une combinaison d'enzymes est préférable en raison de l'hétérogénéité des matrices d'EPS (Kaplan, 2014).

Le contrôle des biofilms par des bactériophages est une stratégie qui représente un grand potentiel pour l'industrie ainsi que dans le traitement de patients infectés par de bactéries pathogènes (thérapie phagique). Les mécanismes antibiofilms des bactériophages mettent en jeu la lyse des bactéries au sein du biofilm, l'induction et la libération d'enzymes de dégradation de la matrice et l'inhibition de la communication cellulaire (ex. molécules anti-QS) (Chegini *et al.*, 2020). Il est important de noter que la spécificité des phages pour leur hôte, tout comme la possible présence ou émergence des résistances au sein des biofilms rendent nécessaire le développement de cocktails de bactériophages adaptés aux pathogènes présents dans un environnement donné. De plus, l'efficacité des phages est limitée par leur capacité de pénétration au sein des biofilms et par l'état physiologique ralenti des bactéries au sein du biofilm (Price and Chapman, 2018; Salmond and Fineran, 2015).

Ces dix dernières années, l'intérêt pour l'utilisation de phages dans l'industrie est croissant et se manifeste par une forte augmentation du nombre de brevets protégeant l'utilisation de cocktails de phages comme agent de biocontrôle (Kaistha and Umrao, 2016).

### **Prévenir la formation des biofilms**

Des efforts de recherche importants ont été mis en œuvre pour prévenir la formation des biofilms afin d'éviter les conséquences économiques et sanitaires liées à leur développement.

Les méthodes préventives regroupent un ensemble de stratégies ciblant les étapes précoces de la formation du biofilm (Fig. 20 ; zone verte). Les mécanismes mis en jeu ont pour but d'empêcher l'attachement des microorganismes aux surfaces et/ou d'inhiber les régulations nécessaires au développement des biofilms.

Parmi les approches préventives, de nombreux auteurs proposent l'utilisation de surfaces aux propriétés antiadhésives ou antimicrobiennes. L'objectif est de repousser ou d'empêcher l'adhésion des microorganismes aux surfaces ou encore de les tuer lorsqu'elles adhèrent (X. Yang *et al.*, 2022). Ainsi, les surfaces peuvent être traitées avec des molécules aux propriétés antiadhésives afin de former des revêtements empêchant l'attachement des microorganismes. Par exemple, il a été montré que l'immobilisation de galabiose permet d'empêcher l'interaction des fimbriae d'*Escherichia coli* avec les supports.

De plus, des molécules aux propriétés antimicrobiennes (bactériocines, ATBs, métaux) peuvent également être immobilisées sur les surfaces (Hetrick and Schoenfisch, 2006; Vijay *et al.*, 2020). Notamment, l'intégration d'argent dans des lentilles de contact a été associée à une réduction de près de 3 log de la biomasse des biofilms formés par *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*. Enfin, certains auteurs ont montré qu'une optimisation du choix des matériaux pouvait permettre de minimiser l'interaction avec certaines bactéries pathogènes (Rogers *et al.*, 1994).

D'autres stratégies ont pour but de prévenir la maturation des biofilms en ciblant la communication cellulaire (molécules anti-QS) ou en empêchant la synthèse de la matrice d'EPS (ex. EDTA) (Tableau 6). Le *quorum sensing* (QS) est un système de régulation ayant pour fonction principale la communication entre microorganismes. Ce système repose sur la sécrétion de molécules de signalisation dans l'environnement et leur interaction avec des systèmes senseurs entraînant l'activation de signalisations cellulaires. Le QS permet ainsi la régulation de nombreux processus cellulaires, dont la formation et la maturation du biofilm (Shrestha *et al.*, 2022). Les systèmes de communication sont une cible intéressante dans la lutte contre la formation de biofilms et des résultats intéressants ont été décrits. En particulier, l'utilisation de molécules de dégradation (ex. lactonase) ou d'inhibition (ex. hordenine) de l'activité des molécules du QS a été associée à la réduction ou l'inhibition de la formation de biofilms (Tableau 6).

L'utilisation d'ATBs est fréquemment utilisée en médecine à des fins préventives avant les opérations invasives. De même, les bactériophages peuvent être utilisés à des fins préventives. Des travaux cliniques ont notamment montré que le traitement d'implants par des bactériophages permet d'empêcher la formation de biofilms formés par *Proteus mirabilis* (254).

### **3.2.2 Propriétés antibiofilm des lactobacilles**

L'échec des traitements conventionnels a contraint la communauté scientifique à développer des stratégies alternatives afin de lutter contre la formation de biofilms négatifs. L'utilisation de bactéries probiotiques fait partie des nouvelles approches les plus prometteuses avec des effets antagonistes sur un large spectre de microorganismes (bactéries, virus et champignons). Les données de la littérature suggèrent que les effets antibiofilms sont spécifiques des souches et mettent en jeu de multiples mécanismes différents. Les souches les plus prometteuses appartiennent au groupe des lactobacilles, notamment *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. fermentum* et *L. rhamnosus* (Carvalho *et al.*, 2021; Giordani *et al.*, 2021).

Les effets antibiofilms exercés contre les pathogènes sont observés à la suite de traitements avec des cellules de probiotiques vivantes, mortes, inactivées ou encore à la suite de traitement avec des produits dérivés issus des probiotiques (Nataraj *et al.*, 2020). Dans la littérature, les cellules de probiotiques non viables (mortes ou inactivées) ou les produits issus de leur lyse ont été regroupés sous le terme de « parabiotiques ». Ainsi, le terme « parabiotiques » se distingue du terme probiotique,



qui correspond par définition à l'utilisation des cellules vivantes. Par ailleurs, le terme « postbiotiques » correspond quant à lui, à l'utilisation de produits sécrétés par les probiotiques. Pour des raisons de simplicité, nous parlerons de « produits dérivés » afin de faire référence aux produits « parabiologiques » et « postbiotiques ». Parmi les produits dérivés, on trouve notamment des peptides antimicrobiens, des biosurfactants, des molécules anti-QS, des métabolites (ex. lactate) qui sont capables de prévenir et d'éliminer la formation des biofilms de micro-organismes pathogènes.

Selon les souches, les probiotiques peuvent avoir des activités permettant de prévenir et/ou d'éliminer la formation des biofilms. Les mécanismes mis en jeu sont multiples et impliquent les bactéries ou leurs produits dérivés.

Dans le cas d'une utilisation préventive des probiotiques et de leurs dérivés, les stratégies mises en jeu impliquent des processus « d'exclusion » et/ou de « compétition ». L'élimination des biofilms déjà établis implique quant à elle des processus dits de « déplacement » (Fig. 22). Notons que les stratégies d'utilisation de dérivés de probiotiques ne sont pas représentées figure 22, mais sont similaires à celles des cellules entières.

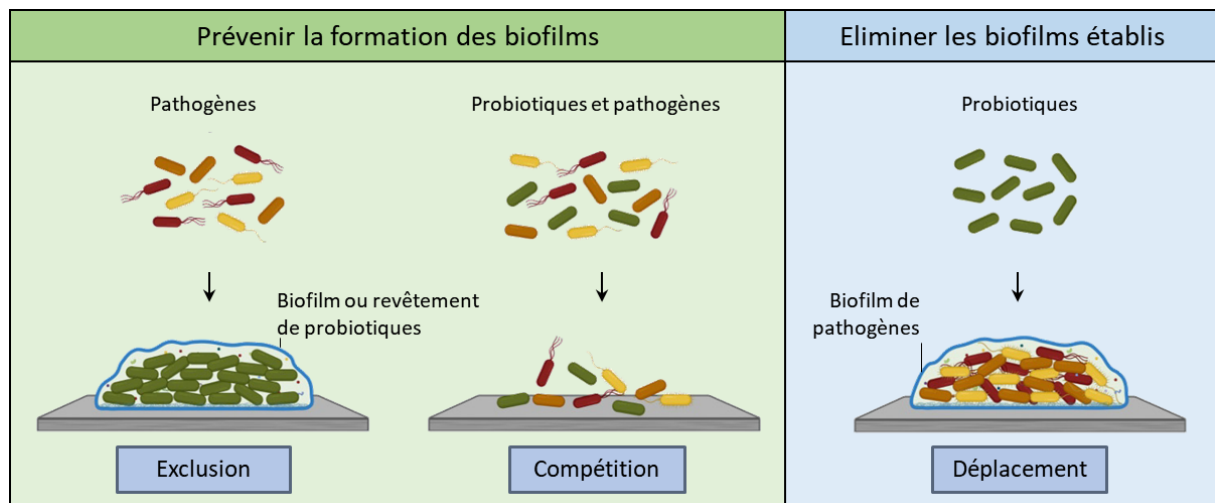


Fig. 22 Utilisation de cellules probiotiques pour lutter contre les biofilms de pathogènes. Les stratégies de « déplacement » impliquent la disruption des biofilms établis. Les stratégies « d'exclusion » et de « compétition » ont pour objectifs d'empêcher les étapes précoces de la formation des biofilms. Adaptée de Fábio M. Carvalho *et al.*, 2021.

Bien que les mécanismes ne soient pas encore bien caractérisés, les probiotiques et leurs dérivés peuvent avoir des effets antibiofilm en créant un environnement défavorable pour les pathogènes (ex. production d'acides organiques, de ROS) et en agissant directement sur les cellules ou la matrice des biofilms (ex. enzymes de dégradation de la matrice, peptides antimicrobiens, biosurfactants, molécules anti-QS) (Tableau 6) (Meroni *et al.*, 2021). Ces modifications ont des effets sur la viabilité des pathogènes ainsi que sur leur capacité à adhérer aux surfaces et à former des biofilms. Les propriétés antibiofilm des lactobacilles sont la plupart du temps le résultat de la combinaison d'activités antibiofilms. Par exemple, les effets inhibiteurs de *L. acidophilus* sur la formation de biofilms par *Staphylococcus aureus* ont été associés à une combinaison d'effets tels que la production de bactériocines, la compétition pour l'accès aux supports ainsi que la réduction des capacités d'adhésion du pathogène (Sadowska *et al.*, 2010). De plus, beaucoup de travaux étudient l'effet antibiofilm des

surnageants de culture de probiotiques (sans cellules). Ces surnageants contiennent un ensemble de molécules libérées par les probiotiques au cours de leur croissance (bactériocines, ROS, acides organiques, biosurfactants, polysaccharides) et leurs activités sont le résultat d'un ensemble d'interactions complexes avec les surfaces, les pathogènes et la matrice des biofilms (Carvalho *et al.*, 2020).

La stratégie « d'exclusion » consiste à former des revêtements de cellules probiotiques ou de dérivés sur les surfaces à protéger, afin d'inhiber l'adhésion des cellules pathogènes (Fig. 22). « L'exclusion » est l'approche qui montre les résultats les plus convaincants avec un fort potentiel dans l'industrie et dans le monde médical. Notamment, le travail publié par Tan L *et al.* (2020) a montré que l'immobilisation de bactéries inactivées *L. casei* sur des implants orthopédiques permet de conférer une protection de 99,98 % contre les infections à *Staphylococcus aureus*. Les mécanismes antibiofilms suggérés mettent en jeu l'inhibition de l'adhésion, la production d'acide lactique et de bactériocines (Tan *et al.*, 2020).

La stratégie de « compétition » consiste à cultiver des probiotiques afin qu'ils entrent en compétition avec les bactéries pathogènes pour l'accès aux nutriments et aux surfaces à protéger. De plus, comme évoqué précédemment, les bactéries préviennent la formation des biofilms en inhibant l'attachement (ex. inhibition des adhésines, biosurfactants, molécules anti-QS) et en produisant des molécules aux propriétés antimicrobiennes (ex. AMP, lactates, acétate). En particulier, plusieurs travaux ont montré que la libération de molécules anti-QS par *L. plantarum* permet une réduction de la communication nécessaire à la formation du biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* (Onbas *et al.*, 2019; Valdéz *et al.*, 2005).

Notons que les mécanismes impliqués dans les stratégies de « compétition » et « d'exclusion » mettent en jeu des processus similaires. Les différences résident principalement dans le traitement préventif des surfaces à protéger dans le cas de la stratégie « d'exclusion ».

Enfin, la stratégie de « déplacement » fait intervenir des mécanismes antimicrobiens et des mécanismes permettant la disruption de l'architecture des biofilms (Fig. 22).

L'efficacité *in vivo* et *in vitro* des probiotiques et de leurs dérivés plaide fortement en faveur de leur utilisation prophylactique et thérapeutique en médecine. Une méta-analyse menée sur 36 articles scientifiques a notamment étudié l'efficacité de probiotiques et de leurs dérivés dans la lutte contre le développement de biofilms pathogènes sur des dispositifs médicaux. Les travaux ont permis d'estimer une réduction de 77 % des biofilms de pathogènes suite aux traitements avec des cellules probiotiques. De plus, le traitement par des « produits dérivés » tels que des biosurfactants, des surnageants de culture (sans cellules) et des exopolysaccharides a été associé à une réduction des biofilms de 70, 76 et 88 % respectivement (Carvalho *et al.*, 2020).

Les probiotiques présentent de nombreux avantages en comparaison aux approches conventionnelles dans la lutte contre les biofilms. Leur statut GRAS facilite leur utilisation dans l'industrie et le monde médical. En effet, les bactéries probiotiques ne sont pas pathogènes et la communauté scientifique leur attribue des effets bénéfiques sur la santé. Ils présentent une faible toxicité et peuvent donc être utilisés à de fortes quantités. Ils offrent une alternative sérieuse à l'utilisation des ATBs en raison de la grande diversité des mécanismes impliqués dans leurs effets antimicrobiens et antibiofilms. Ils ont des effets sur un large spectre de microorganismes pathogènes. De plus, ils sont faciles à cultiver et à

conserver. Enfin, ils résistent au passage dans le TGI et aux processus de conservations industriels (ex. lyophilisation, encapsulation).

Toutefois, il existe également quelques limites à l'utilisation de probiotiques ou de leurs dérivés. Notamment, les bactéries ou les lysats bactériens peuvent contribuer à l'acquisition de gènes de résistance par les pathogènes. Néanmoins, ceci peut être évité par la caractérisation rigoureuse des souches probiotiques utilisées. De plus, les effets des souches sont variables et dépendent des conditions environnementales dans lesquelles elles se trouvent. En d'autres termes, une même bactérie probiotique peut avoir un fort effet antibiofilm dans une condition et n'avoir aucun effet dans d'autres conditions environnementales. Enfin, dans le cas de stratégies « d'exclusion », les biofilms formés par les bactéries probiotiques peuvent se détacher et perdre ainsi leurs activités protectrices (Carvalho *et al.*, 2021; Giordani *et al.*, 2021).

## Chapitre 2 : Vésicules membranaires des bactéries

### 1. Les vésicules membranaires : des structures universelles

#### 1.1 Que sont les vésicules membranaires ?

##### 1.1.1 Définition

Les vésicules membranaires (MVs ; membrane vesicles) aussi appelées vésicules extracellulaires (EVs ; extracellular vesicles) sont des nanoparticules libérées par les cellules. Elles sont délimitées par une membrane lipidique et contiennent des protéines, des acides nucléiques et d'autres composants cellulaires (Gill *et al.*, 2019). La production de MVs a été détectée dans les 3 domaines du vivant suggérant ainsi le caractère universel de ces nanostructures (Deatherage and Cookson, 2012; Gill *et al.*, 2019). Les MVs ont longtemps été ignorées et leur impact sur les interactions entre les organismes avec leurs environnements a largement été sous-estimé jusqu'au début des années 2000. Ce désintérêt peut être imputé en partie à leur petite taille qui implique l'utilisation d'appareils de microscopie électronique très sophistiqués. En effet, ce n'est qu'en 1966 que sont publiées les 1<sup>res</sup> observations de MVs libérées par la bactérie à Gram négatif *Escherichia coli* (Knox *et al.*, 1966) ; soit 16 ans après les observations de particules phagiques par Ernst Ruska. Par ailleurs, les vésicules ont été longtemps considérées comme des débris cellulaires sans importance voire comme de vulgaires artéfacts expérimentaux (Cocucci *et al.*, 2009). Depuis les 20 dernières années, l'étude des MVs est une thématique qui suscite un fort intérêt en raison de la pluralité des fonctions attribuées à ces structures.

Selon leurs tailles, leurs compositions, leurs mécanismes de biogenèse et les cellules qui les libèrent, les MVs sont désignées par divers noms. Ainsi chez les bactéries à Gram négatif, on distingue les vésicules issues du bourgeonnement de la membrane externe appelées OMVs (outer membrane vesicles) et les vésicules issues de la lyse bactérienne appelées OIMVs (outer-inner membrane vesicles) et EOMVs (explosive outer- membrane vesicles) (Fig. 23).

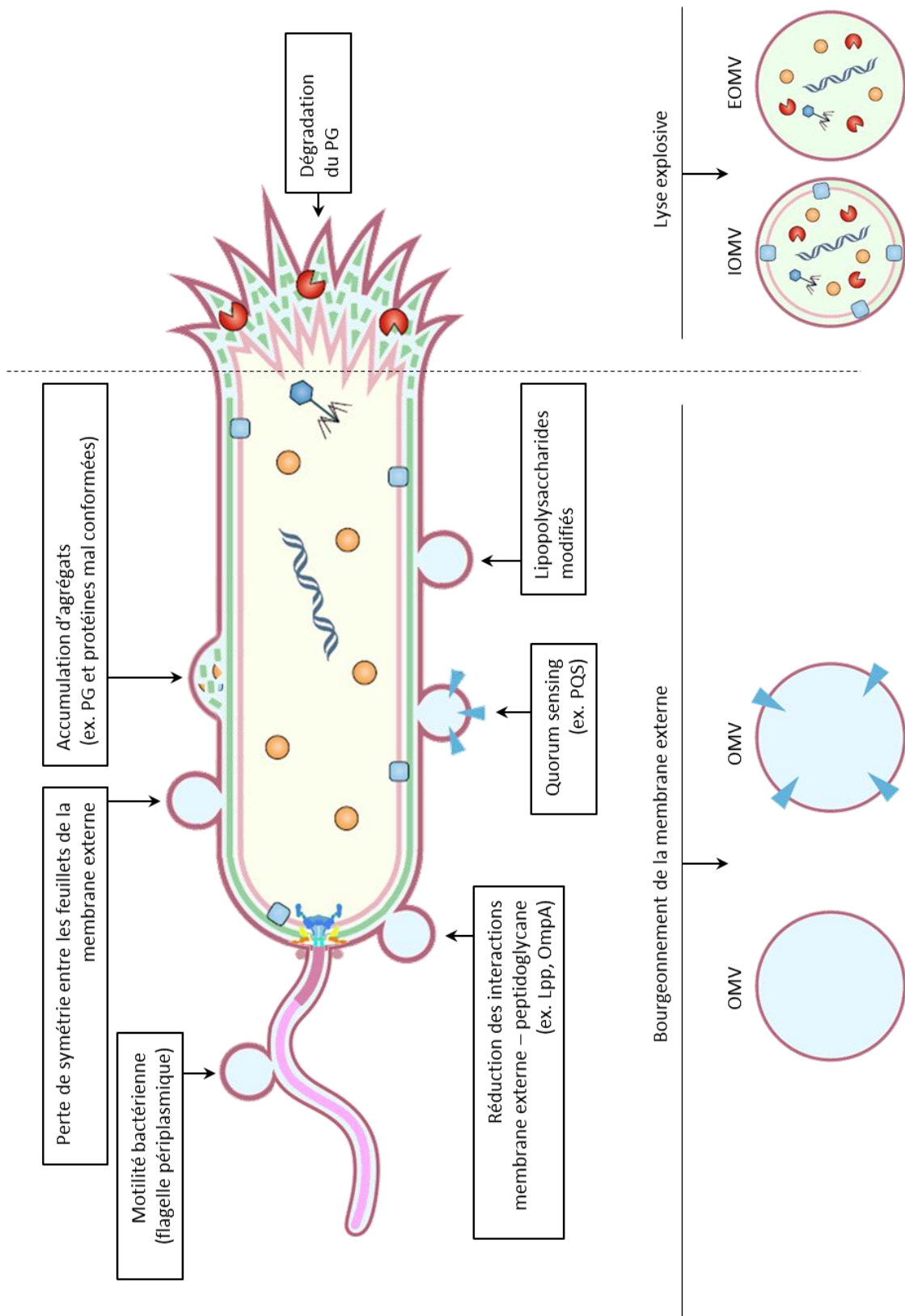


Fig. 23 Type de vésicules membranaires libérées par les bactéries à Gram négatif et principaux mécanismes de production. Adaptée de Toyofuku Masanori *et al.*, 2018.

Chez les bactéries à Gram positif, les MVs sont fréquemment nommées CMVs (cytoplasmic membrane vesicles) d'après l'origine de leur membrane lipidique (Fig. 24).

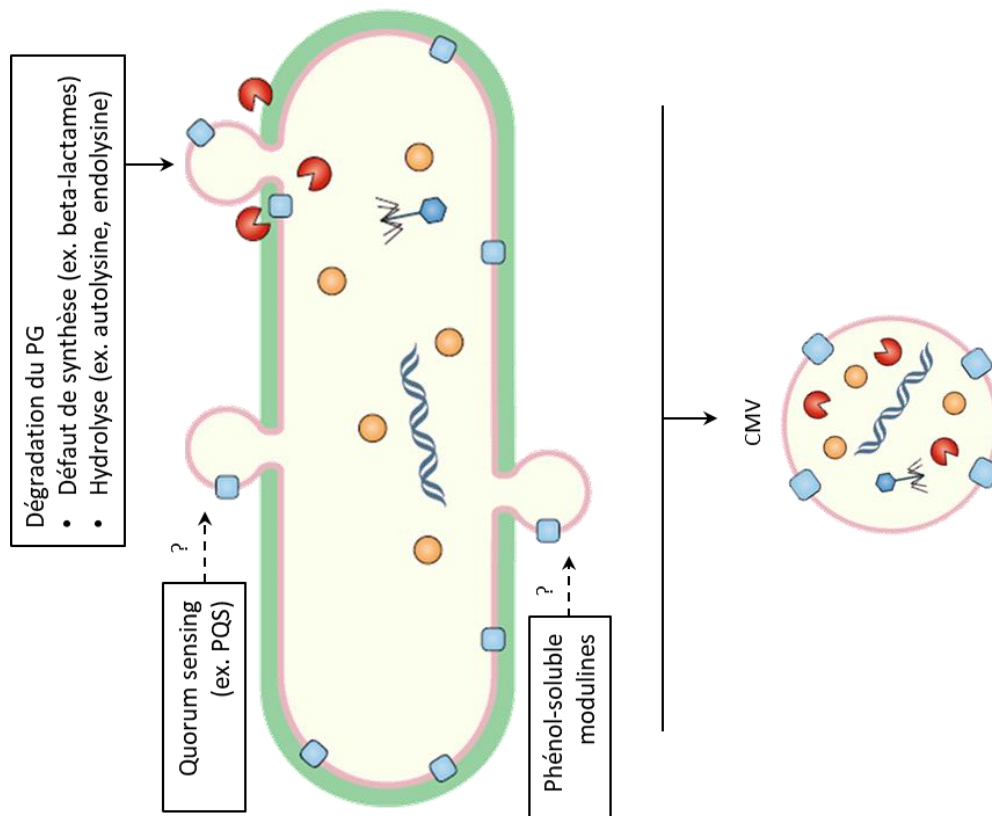


Fig. 24 Type de vésicules membranaires libérées par les bactéries à Gram positif et principaux mécanismes de production. Adaptée de Toyofuku Masanori *et al.*, 2018.

De même, chez les eucaryotes on distingue les exosomes qui sont libérés par fusion des endosomes multivésiculaires avec la membrane plasmique, les microvésicules (ou microparticules ou encore ectosomes) qui se forment par détachement de la membrane plasmique. Enfin, les vésicules apoptotiques ou corps apoptotiques sont libérés par des cellules en fin d'apoptose (Fig. 25).

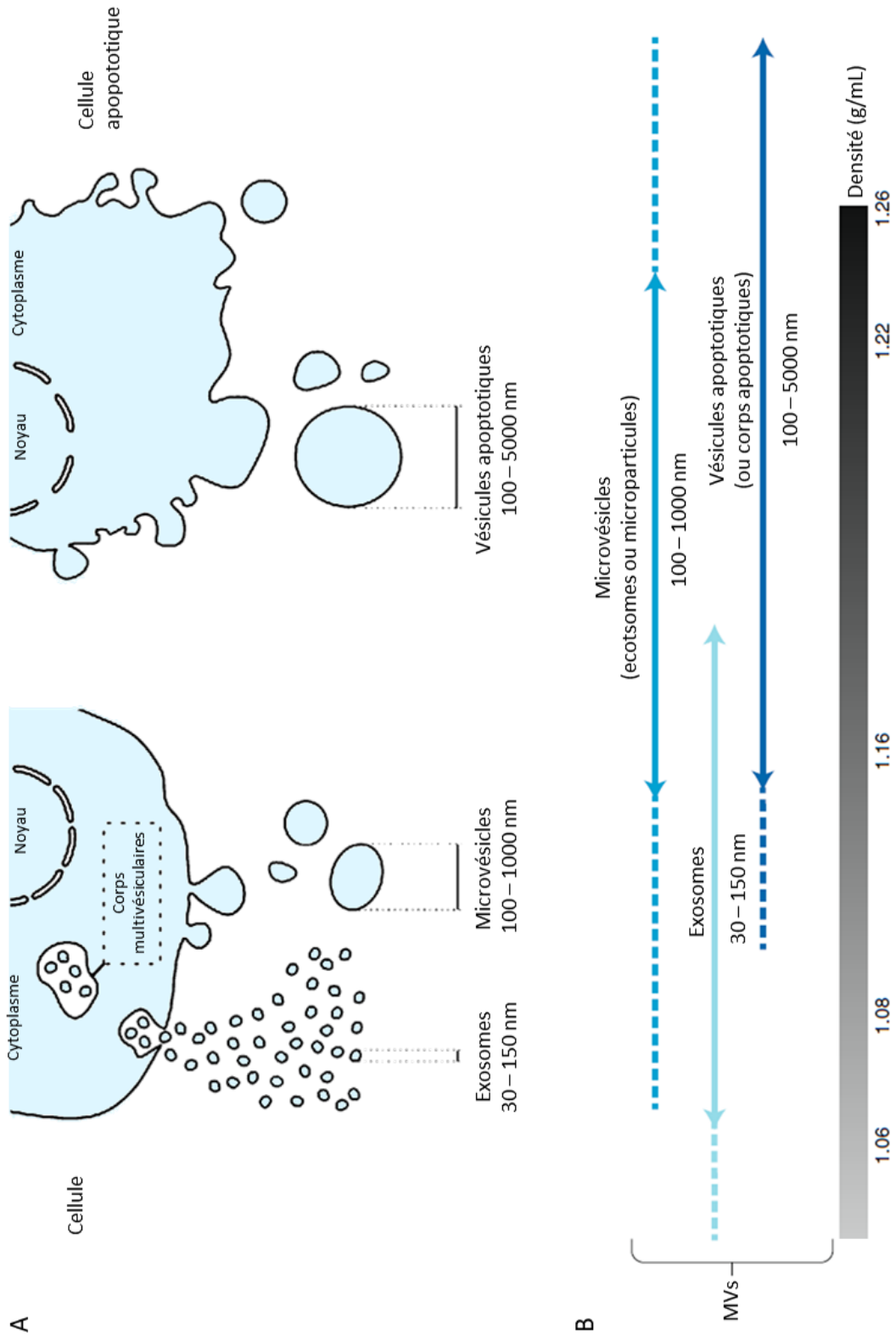


Fig. 25 Types de vésicules membranaires libérées par les cellules eucaryotes selon l'origine des cellules et la voie de biogenèse empruntée. (A) Schéma illustrant le mécanisme de production des principaux types de MVs libérées par les cellules eucaryotes. (B) Taille et densité des types de MVs produites par les cellules eucaryotes. La taille est indiquée en nanomètre et correspond au diamètre des MVs. Adaptées de Zaborowski M P *et al.*, 2015 et Mathieu M *et al.*, 2019.

L'ensemble de ces vésicules est communément regroupé sous le nom de vésicules membranaires (MVs) ou vésicules extracellulaires (EVs). Dans le cadre de cette thèse, nous utiliserons préférentiellement le terme MVs pour faire référence à ces nanostructures, car il permet de mettre en avant le caractère membranaire de ces vésicules. Le terme EVs est toutefois très utilisé dans la littérature, on peut notamment citer le journal scientifique créé en 2012 appelée « Journal of Extracellular Vesicles » qui traite majoritairement de questions liées aux vésicules eucaryotes ("Journal of Extracellular Vesicles," 2012).

### 1.1.2 Diversité des MVs : taille et composition

La formation des MVs est initiée chez tous les organismes au niveau de membranes lipidiques. C'est pourquoi, la composition de ces vésicules est intimement liée aux compartiments dont ils sont issus et à la nature des membranes qui les délimitent.

La membrane plasmique des bactéries est constituée d'une proportion équivalente de lipides et de protéines (Strahl and Errington, 2017) (Lin and Weibel, 2016).

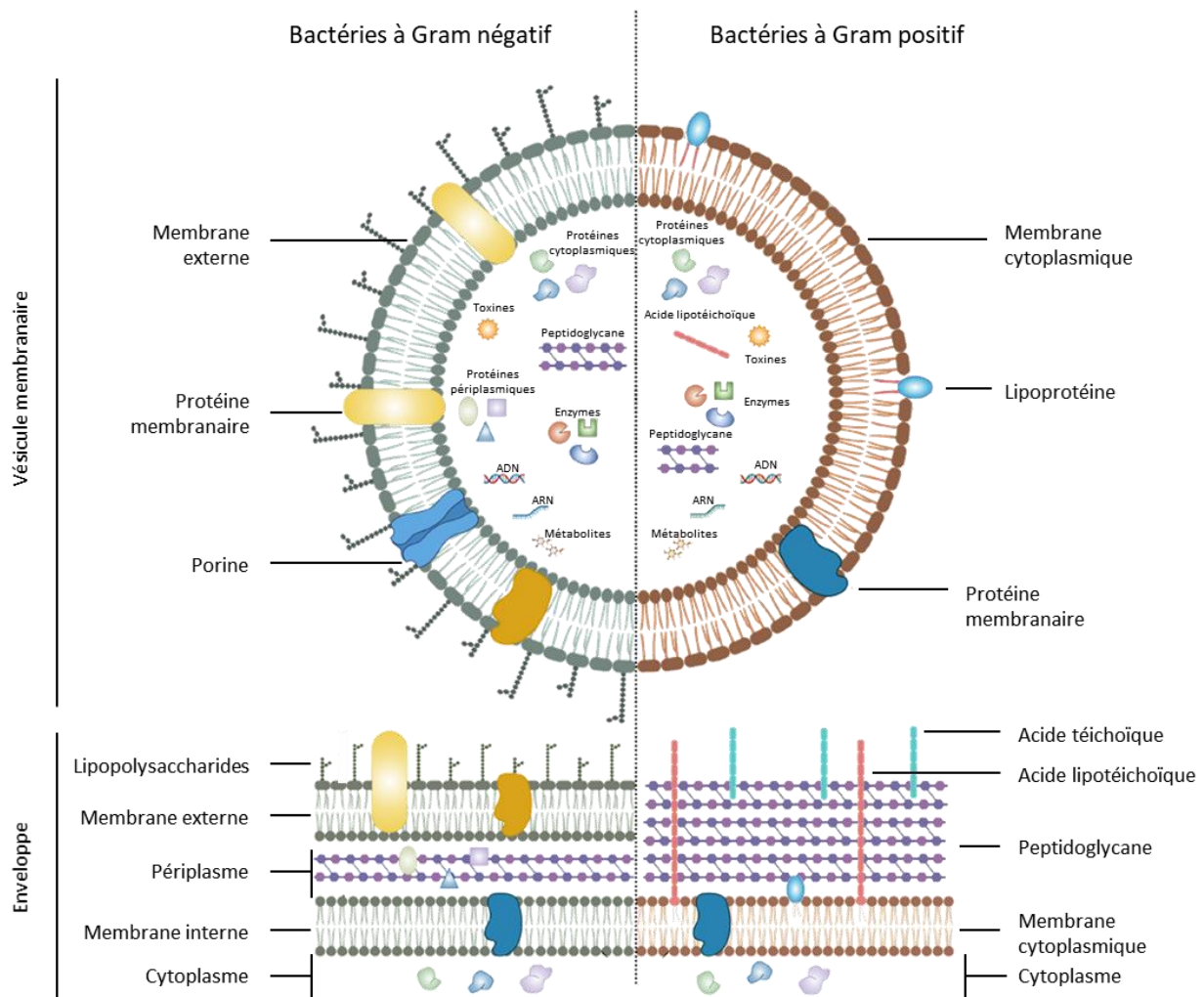


Fig. 26 Représentation schématique de la composition des vésicules membranaires produites par les bactéries à Gram négatif et les bactéries à Gram positif. Adaptée de Xie J *et al.*, 2022.



Chez les bactéries à Gram négatif, la membrane interne est principalement constituée de phosphatidyléthanolamines, phosphatidylglycérols et de cardiolipines. Ces phospholipides sont également présents dans la membrane externe, mais la composition lipidique de cette deuxième membrane se distingue par une quantité élevée de lipide A (appartenant aux molécules de lipopolysaccharides) dans le feuillet externe (Lin and Weibel, 2016) (Fig. 26 et Fig. 27). Les OMVs ont une composition lipidique similaire à la membrane externe des bactéries à Gram négatif (Hoekstra *et al.*, 1976; Lee *et al.*, 2008; J. Lee *et al.*, 2016). Notamment, la présence de LPS est un indicateur fort témoignant de l'origine des OMVs (Fig. 26). De plus, les OMVs sont constituées de protéines périplasmiques, de peptidoglycane ainsi que de lipides et protéines associées à la membrane externe des bactéries (Fig. 26) (Veith *et al.*, 2014).

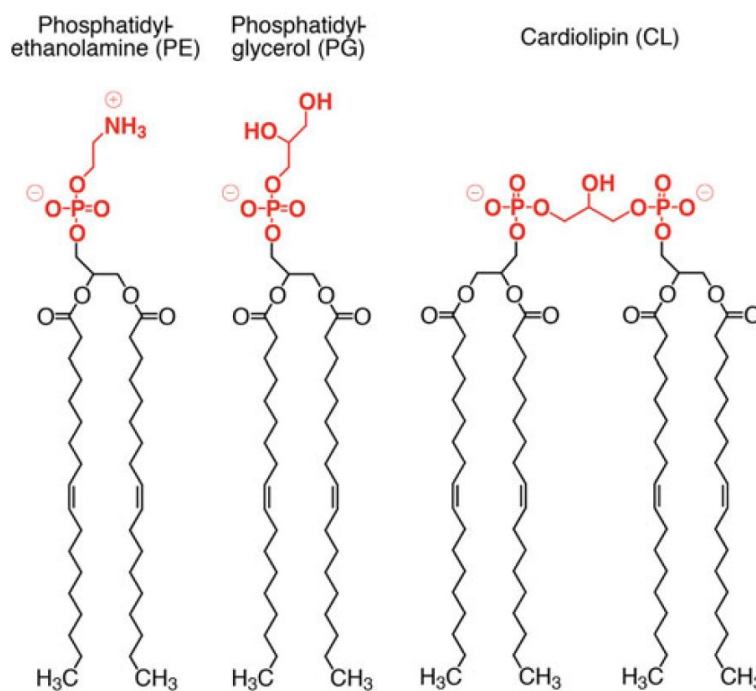


Fig. 27 Structure chimique des principaux phospholipides présents dans les membranes bactériennes. Les phospholipides (PE, PG, PC) sont des glycérophospholipides, dont les têtes polaires (en rouge) sont liées à des queues d'acide gras. Les chaînes d'acides gras peuvent différer par leur nombre de carbones ainsi que par le nombre, la position et la géométrie des insaturations. Par simplicité seules des queues insaturées à 18 atomes de carbone sont représentées. Adaptée de Ti-Yu Lin *et al.* 2016.

Les vésicules de bactéries à Gram positif ou encore d'archées emportent une partie du contenu cytoplasmique lors de leur formation. C'est pourquoi les vésicules sont délimitées par des membranes de composition similaire à la membrane cytoplasmique et contiennent des acides nucléiques, des protéines, des toxines et autres composants cytoplasmiques capturés lors de leur formation (Fig. 26). Les lipides majoritaires des membranes plasmiques de bactéries à Gram positif sont les phosphatidylglycérols, les cardiolipines et les acides lipotéichoïques (LTA) (Fig. 26). Une des différences importantes entre la composition lipidique des vésicules et celle de la membrane plasmique des bactéries est l'absence de cardiolipines chez certaines bactéries à Gram positif (Fig. 27) (Resch *et al.*, 2016). Une explication possible de l'exclusion des cardiolipines est liée à leur encombrement stérique

qui est connu pour engendrer de fortes déformations des vésicules membranaires (Fig. 27) (Tomšič *et al.*, 2005).

Tout comme leur composition, la taille des MVs bactériennes varie selon les organismes qui les produisent, leur état physiologique et les mécanismes impliqués dans leur biogenèse. Ainsi, les vésicules bactériennes ont une taille généralement comprise entre 20 à 500 nanomètres de diamètre. L'amplitude de taille des vésicules eucaryotes est beaucoup plus importante, allant de 50 jusqu'à 5000 nm de diamètre dans le cas de corps apoptotiques (Fig. 25 et Fig. 27).

Cette variabilité de taille et de composition est responsable de la grande diversité des fonctions exercées par les vésicules. Cette diversité place les MVs au carrefour de diverses thématiques majeures de la biologie telles que la résistance aux antibiotiques, les transferts horizontaux de gènes, la communication inter et intra espèce, la formation de biofilms, la pathogenèse ou encore le développement d'outils à visées thérapeutiques.

## **1.2 Isolement, observation et quantification des MVs**

### **1.2.1 Méthodes d'isolement des MVs**

La séparation des MVs des cellules et des autres composés présents dans les milieux biologiques est une étape clé de l'étude des vésicules. En effet, l'isolement des MVs permet de garantir la fiabilité des résultats afin d'éviter les interprétations erronées liées à la présence de nanoparticules contaminantes (Furi *et al.*, 2017; Davis *et al.*, 2019).

Les stratégies d'isolement les plus utilisées dans la littérature reposent sur l'utilisation des propriétés physicochimiques des MVs telles que la taille, la densité, la charge, la viscosité ou encore la présence d'antigènes de surface (Liangsupree *et al.*, 2021). Selon la composition des milieux dans lesquels les vésicules se trouvent, leur isolement est rendu plus ou moins difficile par la présence de contaminant aux propriétés physicochimiques proches. En particulier, les protéines solubles de haut poids moléculaire, les agrégats protéiques, les lipoprotéines et d'autres nanoparticules sont fréquemment présents dans les milieux de culture et les liquides biologiques. Par exemple dans les selles, le sang et le plasma, les MVs peuvent être co-isolées avec des lipoprotéines ou d'autres nanoparticules (Fig. 28) (Simonsen, 2017; Tulkens *et al.*, 2020). De surcroît, comme expliqué précédemment (Fig. 23-28), la taille et la composition des vésicules sont très hétérogènes, même lorsqu'elles sont produites par une population clonale de cellules. Pour toutes ces raisons, aucune stratégie d'isolement des MVs ne permet d'obtenir une pureté maximale. Selon ses objectifs, l'expérimentateur doit faire un choix entre le rendement et la pureté de la fraction vésiculaire obtenue après purification.

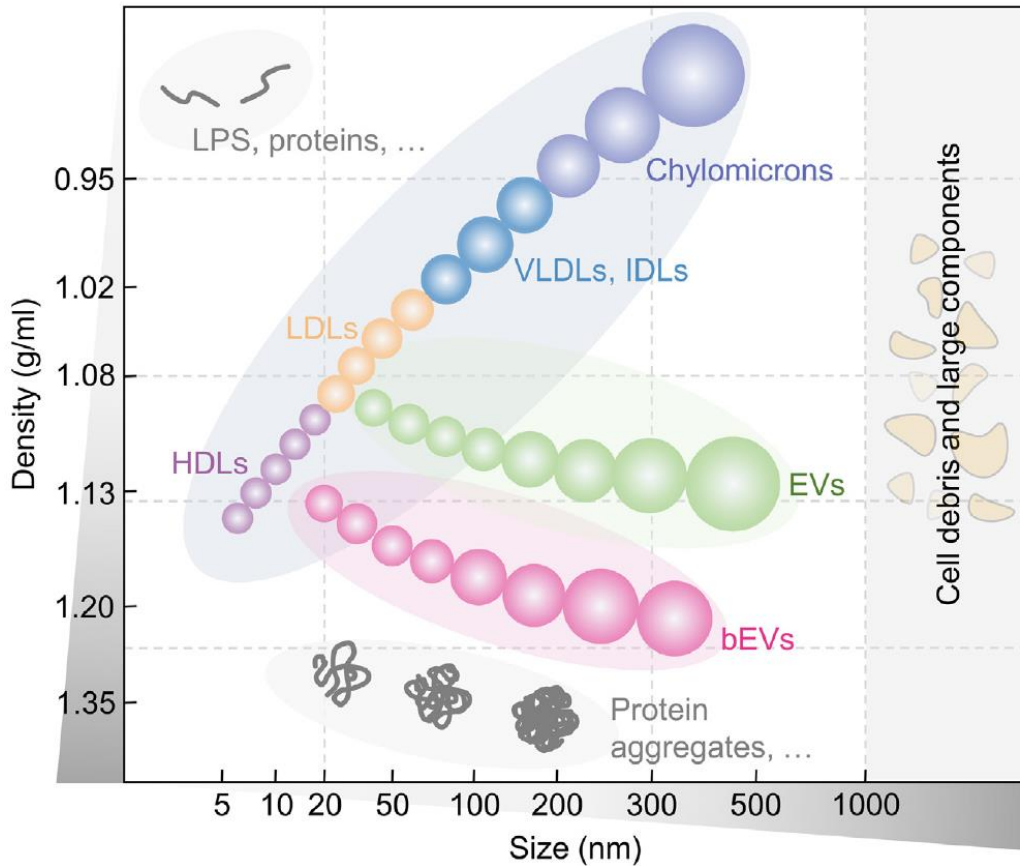


Fig. 28 Graphique taille/densité des vésicules membranaires bactériennes et des nanoparticules fréquemment présentes dans les selles, le sang et le plasma. Les EVs (ou MVs) d'eucaryotes ont une densité comprise entre 1 083 et 1 111 g/mL. Les vésicules membranaires bactériennes (bEVs) ont une densité plus élevée comprise entre 1 133 et 1 201 g/mL. Abréviations : HDL, lipoprotéine de haute densité ; IDL, lipoprotéine de densité intermédiaire ; LDL, lipoprotéine de basse densité ; LPS, lipopolysaccharide ; VLDL, lipoprotéine de très basse densité ; EVs, vésicules membranaires eucaryotes ; bEVs, vésicules membranaires bactériennes. Adaptée de Xie J *et al.*, 2022.

Les principales méthodes utilisées dans la littérature pour l'isolement des MVs sont les méthodes de centrifugation différentielle (incluant au moins une étape d'ultracentrifugation), l'utilisation de gradients de densité, la chromatographie d'exclusion stérique, l'ultrafiltration, l'isolement par affinité et la précipitation (Fig. 29, Tableau 7) (Coumans *et al.*, 2017; Liangsupree *et al.*, 2021).

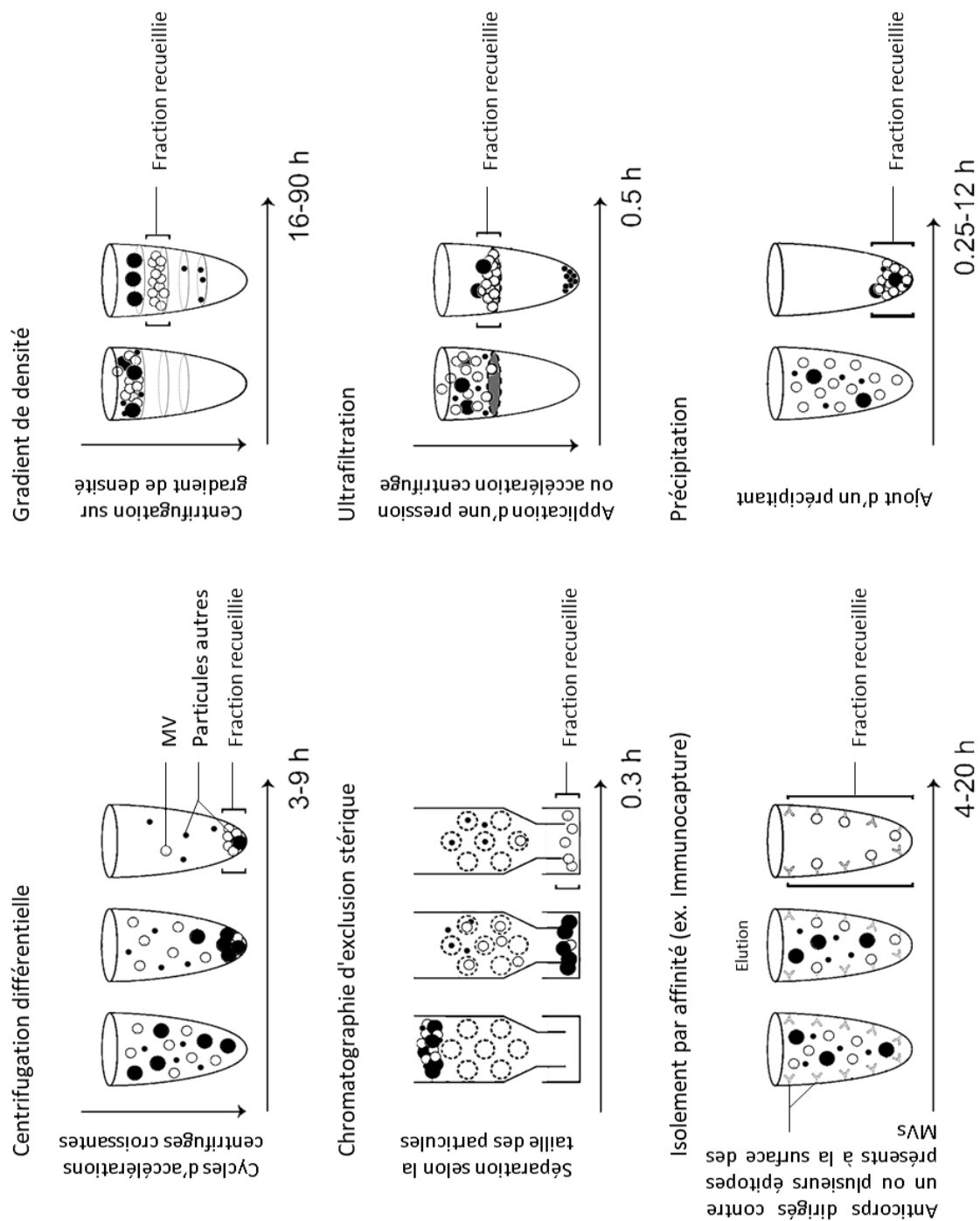


Fig. 29 Illustration schématique des méthodes les plus couramment utilisées pour isoler les vésicules membranaires. Adaptée de Coumans *et al.*, 2017.

Les méthodes de centrifugation différentielle sont les méthodes les plus couramment utilisées (Coumans *et al.*, 2017; Momen-Heravi *et al.*, 2013). Ces stratégies d'isolement reposent sur la séparation des particules sur la base de leur vitesse de sédimentation. La vitesse de sédimentation des particules dépend de leur densité, de leur taille et de leur forme selon la relation définie par la loi de Stokes (Livshits *et al.*, 2015). Ainsi, plusieurs cycles de centrifugation à vitesse croissante sont réalisés afin d'éliminer successivement les particules les plus grosses par sédimentation. Une fois la majorité des particules non vésiculaires éliminées, une ou plusieurs centrifugations à grande vitesse (ou

ultracentrifugation) sont réalisées afin de recueillir les fractions enrichies en vésicules au fond du tube d'ultracentrifugation (Fig. 29). Cependant, ces stratégies présentent le désavantage de co-isoler des nanoparticules aux vitesses de sédimentation similaires à celles des vésicules, notamment des lipoprotéines ou encore des agrégats protéiques (Tableau 7).

Les méthodes d'ultrafiltration sont généralement utilisées afin de concentrer les vésicules présentes en faible quantité dans des échantillons de volume important. L'ultrafiltration consiste à séparer les particules selon leur taille grâce à des membranes filtrantes (ex. cellulose) sur le principe du tamisage moléculaire (Klimentová and Stulík, 2015). Les filtres sont un réseau de pores de taille régulière permettant la rétention des particules dont la taille est supérieure aux pores de la membrane. Les filtres d'ultrafiltration généralement utilisés pour la concentration des vésicules ont une limite de rétention de 50 ou 100 kDa (Liangsupree *et al.*, 2021). L'ultrafiltration permet ainsi de concentrer de larges volumes rapidement tout en éliminant les molécules inférieures au seuil d'exclusion. Toutefois, en raison de la faible pureté des échantillons recueillis après ultrafiltration, les fractions obtenues sont généralement soumises à d'autres étapes de purification supplémentaires (Fig. 29 et Tableau 7).

La pureté des fractions vésiculaires obtenues par centrifugations différentielles et ultrafiltration peut être améliorée en réalisant une étape de séparation sur gradient de densité ou par une étape de chromatographie d'exclusion stérique (Fig. 29) (Lobb and Möller, 2017; Tulkens *et al.*, 2020).

La centrifugation sur gradient de densité est une méthode qui permet de séparer les particules en fonction de leur densité. Les fractions vésiculaires à purifier sont déposées sur un gradient continu ou discontinu (généralement de sucrose ou d'idodixanol) et les échantillons sont ensuite centrifugés à haute vitesse (80 000 – 150 000 g) afin de séparer les différentes particules (Klimentová and Stulík, 2015). La centrifugation sur gradient de densité est l'une des approches offrant la meilleure pureté, cependant les rendements de purification obtenus après purification sont relativement faibles (Klimentová and Stulík, 2015). De plus, cette méthode ne permet pas d'éliminer efficacement les lipoprotéines de haute densité (Fig. 29 et Tableau 7).

La chromatographie d'exclusion stérique est une méthode qui permet de séparer les particules sur la base de leur volume hydrodynamique (c.-à-d. la taille des particules en solution) (Lobb and Möller, 2017). Les particules sont donc séparées en solution dans une colonne contenant un réseau de polymère (généralement du sepharose). Suivant leur volume hydrodynamique, les particules peuvent plus ou moins pénétrer dans le gel, ce qui affecte leur temps d'élution. Les molécules ayant le plus grand volume hydrodynamique ont un temps d'élution rapide alors que les composants les plus petits sont retenus plus longtemps dans la matrice de la colonne. Cette méthode présente l'avantage de ne pas nécessiter d'équipement coûteux et de permettre une réduction de la contamination protéique. Toutefois, elle ne permet pas d'éliminer les particules de tailles similaires (ex. lipoprotéines, agrégats protéiques) et entraîne une dilution des échantillons. C'est pourquoi la chromatographie d'exclusion stérique est plutôt adaptée pour purifier des fractions vésiculaires préalablement concentrées (Fig. 29 et Tableau 7) (Lobb and Möller, 2017; Tulkens *et al.*, 2020).

Les stratégies d'isolement par affinité regroupent un ensemble de méthodes reposant sur l'interaction entre ligands et récepteurs présents à la surface des MVs (Liangsupree *et al.*, 2021). La majorité des stratégies utilisées à ce jour reposent sur l'utilisation d'anticorps dirigés contre des antigènes présents à la surface des vésicules. Ainsi, les anticorps (généralement monoclonaux) de forte affinité sont immobilisés sur des surfaces (telles que des billes magnétiques, des puces ou encore des membranes),

afin de capturer spécifiquement les MVs et de les séparer des particules contaminantes. Cette méthode permet d'obtenir une grande pureté de vésicules et permet également d'isoler des sous-populations vésiculaires sur la base de leurs antigènes de surface (Coumans *et al.*, 2017). Toutefois, l'immunocapture présente l'inconvénient d'être une méthode relativement onéreuse dont l'efficacité dépend principalement de la qualité des anticorps. De plus, ces méthodes requièrent une bonne connaissance préalable de la composition antigénique de la surface des vésicules afin de produire des anticorps adéquats (Fig. 29 et Tableau 7). C'est pourquoi les stratégies d'isolement par affinité sont majoritairement utilisées pour la capture de vésicules d'organismes modèles.

Les MVs peuvent également être précipitées à l'aide polyéthylène glycol (PEG) ou encore de lectines (telles que la concanavaleine A ou la phytohémagglutinine) (Konoshenko *et al.*, 2018). Le PEG est un polymère soluble dans l'eau, non toxique et non dénaturant qui permet une précipitation des particules en solution. Cette précipitation permet de sédimenter les vésicules par centrifugation à basse vitesse et n'implique donc pas d'équipement d'ultracentrifugation spécialisé (Coumans *et al.*, 2017). De même, les lectines sont des protéines qui permettent une agglutination des particules par interaction avec les carbohydrates (Samsonov *et al.*, 2016). Les lectines entraînent ainsi la précipitation des vésicules qui sont ensuite récupérées par centrifugation à basse vitesse. Bien que rapides et peu coûteuses, ces méthodes de précipitation conduisent à la co-précipitation de débris non vésiculaires et sont donc peu adaptées lorsque des analyses nécessitant une bonne pureté doivent être réalisées.

Enfin, des approches combinant plusieurs des méthodes décrites ci-dessus sont largement utilisées dans la littérature afin d'augmenter la pureté des fractions vésiculaires issues d'échantillons complexes tels que les biofluides (ex. selles, sérum) (Fig. 28) (Rafael Prados-Rosales *et al.*, 2014). Par exemple, les travaux de Tulkens *et al.*, ont montré que la combinaison de 3 méthodes incluant des centrifugations différentielles, une étape de chromatographie d'exclusion stérique et une séparation sur gradient de densité, permet d'isoler spécifiquement les MVs bactériennes présentes dans des biofluides humains contenant diverses particules contaminantes (Tulkens *et al.*, 2020).

### **1.2.2 Conservation et préservation de l'intégrité des MVs**

La conservation des MVs est un enjeu majeur étant donné que les conditions de stockage sont susceptibles de compromettre leur intégrité et d'affecter leurs propriétés morphologiques et fonctionnelles (Jeyaram and Jay, 2017). Notamment, les conditions de stockage peuvent favoriser la libération du contenu et impacter le nombre et la taille des MVs présentes en solution (Gelibter *et al.*, 2022). De même, les composants présents dans les vésicules (lipides, protéines, acides nucléiques, autres) peuvent être altérés, entraînant ainsi des pertes d'activité plus ou moins importantes (Kusuma *et al.*, 2018). Les principaux facteurs d'altération impactant les propriétés morphologiques et fonctionnelles des MVs lors de leur conservation sont la température, le temps et la composition des solutions de stockage (pH, agents cryoprotecteurs) (Jeyaram and Jay, 2017; Kusuma *et al.*, 2018).

La majorité des travaux abordant la conservation des MVs ont été menés sur des vésicules produites par organismes eucaryotes, en particulier mammifères. Malgré l'importance de cette thématique, la littérature ne fournit à ce jour qu'un nombre limité de données, en raison des contraintes techniques liées aux méthodes d'analyse (voir section 1.2.2 et 1.2.3), à la diversité des approches utilisées et à l'absence d'un consensus clair sur les critères d'évaluation. Par ailleurs, ces problématiques expliquent également, les travaux contradictoires qui rendent difficile la formulation de conclusions claires. C'est

pourquoi à ce jour aucune condition optimale de stockage des MVs n'a pu être établie de manière consensuelle.

Les approches de conservation des vésicules peuvent être divisées en deux grandes catégories. Les approches de séchage (ex. lyophilisation, atomisation) qui restent restreintes à certaines applications, et les méthodes de conservation par le froid (cryopréservation) majoritaires (Bahr et al., 2020; Lyu et al., 2022). Bien que les approches de séchage aient un impact important sur l'intégrité des membranes, elles présentent plusieurs avantages tels qu'une forte stabilité à l'état sec et une facilité de stockage. De plus, elles assurent la préservation de l'activité des composés thermosensibles et des composés sujets aux dégradations enzymatiques (Bahr et al., 2020). Dans le cas des méthodes de conservation par le froid, les MVs sont majoritairement cryopréservées par suspension dans du PBS et stockage à 4 °C pour des périodes courtes (quelques heures à quelques jours). Pour des périodes de stockage plus longues (quelques mois à plusieurs années), une température de -80 °C est recommandée (Kusuma et al., 2018). Ces approches de stockage ont pour objectif d'éviter les cycles de congélation-décongélation connus pour fortement endommager les MVs. Toutefois, les conditions de stockage à 4 °C et -80 °C ont également un impact plus ou moins important sur l'intégrité et les fonctions des vésicules (Deville et al., 2021; Görgens et al., 2022; Kusuma et al., 2018). Afin d'augmenter leur stabilité lors de la congélation, des cryoprotecteurs peuvent être ajoutés aux tampons de suspension (Bahr et al., 2020). On distingue les cryoprotecteurs dits pénétrants (ex. le glycérol, le DMSO et l'éthylène glycol) capables de diffuser à travers les membranes lipidiques et les cryoprotecteurs dits non pénétrants (ex. le saccharose, le mannose, le tréhalose et autres sucres) qui ne pénètrent pas les membranes lipidiques (Bahr et al., 2020; Gelibter et al., 2022; Görgens et al., 2022; Walker et al., 2022). La protection apportée par les cryoprotecteurs dépend de leur dosage approprié afin d'éviter les dommages liés à la congélation (concentration trop faible) et à leur toxicité (concentration trop forte).

Pour des raisons de reproductibilité des résultats entre laboratoires et de compatibilité avec diverses méthodes d'analyse (biologique, biochimique ou encore physique), de nombreux chercheurs préfèrent la cryopréservation des MVs dans du tampon PBS sans cryoprotecteurs malgré des travaux suggérant une faible stabilité dans ces conditions (Kusuma et al., 2018). L'expérimentateur est donc amené à choisir les conditions de stockage des MVs selon ses objectifs, les contraintes expérimentales et la nature des composés étudiés.

Tableau 7 Comparaison des méthodes les plus couramment utilisées pour isoler les vésicules membranaires.

Méthodes	Principe de séparation	Avantages	Inconvénients	Pureté des MVs
Centrifugation différentielle (CD) (dont ultracentrifugation)	Vitesse de sédimentation (VS)	Réduction des contaminants protéiques	Faible rendement, co-isolément de particules de VS similaire, agrégats protéiques	Moyenne
Gradient de densité (GD)	Densité	Augmentation de la pureté	Faible rendement, co-isolément de particules de densité similaire, long	Bonne
Chromatographie d'exclusion stérique (CES)	Volume hydrodynamique (VH)	Réduction des contaminants protéiques	Dilution des échantillons, co-isolément de particules de VH similaire	Bonne
Ultrafiltration (UF)	Taille (séparation membranaire par tamisage)	Concentration des échantillons, rapide, possibilité de traiter d'importants volumes	Agrégats protéiques, concentration des contaminants de haut poids moléculaire	Faible
Isolément par affinité (IA)	Capture spécifique reposant sur l'interaction ligand-récepteur	Ciblage de sous populations vésiculaires	Coûteux, interactions aspécifiques	Excellente
Précipitation (PP)	Précipitation	Peu coûteux, possibilité de traiter d'importants volumes	Forte contamination	Très faible

N. B. Quelques articles utilisant une ou une combinaison de méthodes d'isolement des vésicules membranaires produites pas des bactéries appartenant à la famille des *Lactobacillaceae* : (Choi *et al.*, 2020a) CD, UF ; (H. Kim *et al.*, 2020) CD, UF, GD ; (Dean *et al.*, 2020) CD, GD ; (Bäuerl *et al.*, 2020) CD/PP ; (Kuhn *et al.*, 2020) CD, CES ; (Zaborowska *et al.*, 2020) CD ; (Wubbolts *et al.*, 2003) IA.



### 1.2.3 Méthodes d'analyse des MVs

L'analyse des MVs peut être réalisée par diverses approches, notamment des approches physiques (ex. taille, charge), chimiques (ex. protéomique, lipidomique, RNAseq, métabolomique) ou biologiques (ex. immunomodulation) (Paganini *et al.*, 2022). Toutefois, un certain nombre de challenges techniques rendent ce travail délicat. La difficulté de l'étude des MVs est liée à leur petite taille qui limite grandement le nombre d'outils disponibles. En effet, il existe peu d'outils permettant de quantifier la concentration des vésicules en solution et la plupart du temps, il est difficile d'estimer la proportion des particules contaminantes (Tableau 8). Dans ce contexte, nous allons présenter de manière comparative les différentes méthodes d'analyses physiques couramment utilisées pour caractériser la taille et quantifier la concentration des MVs en solution.

Le DLS (Dynamic Light Scattering), le MDLS (Multi-angle DLS) et le NTA (Nanoparticle Tracking Analysis) sont des méthodes très utilisées qui permettent d'estimer la taille de nanoparticules en suspension grâce à la mesure du mouvement brownien (Anderson *et al.*, 2013; Naiim *et al.*, 2015; Stetefeld *et al.*, 2016). Le mouvement brownien correspond au mouvement aléatoire des particules en solution du fait de leurs interactions avec les molécules qui les entourent. Plus une particule en suspension est grosse par rapport aux molécules de son environnement proche, plus l'effet des interactions avec ces molécules sur son mouvement sera réduit. À l'inverse, le mouvement de petites particules sera plus important du fait des interactions avec les autres molécules. La taille des particules est ainsi estimée grâce à la relation Stokes-Einstein établissant un lien entre la taille des particules et leur mouvement aléatoire (ou mouvement Brownien) (Anderson *et al.*, 2013).

Dans la méthode de DLS et de MDLS, le mouvement Brownien des particules est mesuré grâce à l'analyse au cours du temps de l'intensité de diffraction de la lumière d'un laser monochromatique placé sur la trajectoire de l'échantillon (Naiim *et al.*, 2015). En traversant la suspension de particules, la lumière du laser est diffractée dans toutes les directions lorsque des particules se trouvent sur sa trajectoire. Ainsi, le déplacement des particules soumises au mouvement Brownien fait varier l'intensité de diffraction au cours de temps. Cette fluctuation de l'intensité de diffraction au cours du temps permet ainsi de déterminer la taille des particules.

La différence principale entre le DSL et le MDLS repose dans le nombre et la position des détecteurs de la lumière diffractée. Les mesures de DLS à angle unique ne sont pas adaptées aux échantillons polydisperses, car les grosses molécules peuvent masquer la présence des plus petites particules, ce qui entraîne une surestimation de la taille de la population particulaire. L'approche de DLS multi-angle (MDLS) intègre les données acquises sous plusieurs angles grâce à plusieurs détecteurs (généralement trois). De cette manière, la distribution de la taille des particules fournie par les MDLS est robuste et permet l'analyse d'échantillons mono ou polydisperses (Naiim *et al.*, 2015).

Une des limites importantes de ces méthodes est qu'elles ne permettent pas d'estimer la quantité de particules (Tableau 8).

Contrairement au DLS, le NTA est une méthode qui permet de mesurer individuellement la taille des particules et permet ainsi de déterminer la concentration des particules d'une suspension. Le NTA détermine le mouvement brownien des particules par l'analyse d'enregistrements vidéo dans lesquels les particules sont suivies individuellement au cours du temps. Les particules sont visualisées grâce à la lumière diffractée d'un laser (Dragovic *et al.*, 2011). En effet, en traversant la trajectoire d'un faisceau laser, les particules entraînent la diffraction de la lumière qui est enregistrée sous forme de

séquences vidéo. Ces vidéos sont analysées par un programme qui localise et suit les particules au cours du temps, afin de calculer leur taille grâce à la relation de Stokes-Einstein (Dragovic *et al.*, 2011; Anderson *et al.*, 2013). Dans cette configuration, le NTA ne donne pas d'information sur la nature des particules et ne permet donc pas de distinguer entre les MVs et les particules non vésiculaires (Tableau 8).

Toutefois, le NTA offre la possibilité d'ajouter des modules laser permettant d'exciter les particules avec plusieurs longueurs d'onde (Carnell-Morris *et al.*, 2017). Cette approche de NTA fluorescent (ft-NTA) permet de différencier les vésicules des particules non vésiculaires, en marquant les vésicules avec des marqueurs fluorescents spécifiques des membranes lipidiques (Tableau 8) (Carnell-Morris *et al.*, 2017). De plus, l'utilisation de la fluorescence permet également de marquer des sous-populations de vésicules grâce à l'utilisation d'anticorps couplés à des fluorophores.

Le TRPS (Tunable Resistive Pulse Sensing) est une méthode de mesure de la taille et de la concentration de particules en solution qui repose sur le principe du compteur de Coulte. Contrairement au NTA et aux DSL, cette méthode ne repose pas sur la diffusion de la lumière (« How Does Tunable Resistive Pulse Sensing Measure Particles?, » 2022). Le TRPS permet de mesurer individuellement les particules dans une solution d'électrolytes en les faisant passer à travers un nanopore de diamètre ajustable. Une tension est appliquée à travers le nanopore et l'appareil détecte le changement de résistance électrique lors du passage des particules à travers le nanopore. Ce changement correspond à un blocage transitoire du courant ionique dont l'intensité et la fréquence sont proportionnelles à la taille et à la concentration des particules de l'échantillon. De plus, la durée du blocage permet également de calculer la charge de surface des particules (« How Does Tunable Resistive Pulse Sensing Measure Particles?, » 2022). Le TRPS présente l'avantage de permettre l'analyse d'échantillons polydisperses avec une très bonne résolution. Toutefois, comme le DLS, le MDLS et le NTA, cette méthode présente l'inconvénient de ne pas permettre de distinguer les MVs des particules non vésiculaires (Tableau 8) (Anderson *et al.*, 2013).

La méthode de DCS (Differential Centrifugal Sedimentation) est un peu moins répandue, mais permet une très bonne résolution de la distribution de la taille d'échantillons polydisperses (Minelli *et al.*, 2018). Le DCS repose sur l'analyse du temps de sédimentation des particules dans un disque rotatif contenant un gradient de densité (généralement un gradient de saccharose). Les échantillons sont injectés dans un disque qui est ultracentrifugé. L'ultracentrifugation entraînant ainsi la séparation des particules en fonction de leurs différences de taille, de densité et de forme, conformément à la loi de Stokes (Minelli *et al.*, 2018). Notons que cette méthode ne permet pas de distinguer entre les MVs et les particules non vésiculaires, et ne permet pas d'estimer la concentration des échantillons (Tableau 8).

La cytométrie en flux est une approche utilisée par de nombreux laboratoires pour quantifier et étudier les MVs. Toutefois, la plupart des cymomètres en flux ont un seuil minimum de détection supérieur ou égal à 200 nm de diamètre, ce qui est largement supérieur à la taille des exosomes et des vésicules produites par de nombreuses bactéries (Morales-Kastresana and Jones, 2017). Récemment, de nouveaux cymomètres en flux de haute résolution ont été développés afin de répondre à cette problématique (Nanofcm, 2021). Notamment, certains appareils tels que le Nanoanalyzer (nFCM) de l'entreprise NanoFCM permettent de détecter des particules jusqu'à 40 nm de diamètre (Nanofcm, 2021).

Dans les systèmes de cytométrie en flux, les particules en solution passent dans le trajet optique de plusieurs lasers de longueurs d'onde différentes. La diffraction de la lumière provoquée par les particules en face du rayon laser permet d'estimer la taille des particules (paramètre FSC) et la mesure de la lumière diffractée sur le côté donne une mesure de la granularité des particules (paramètre SSC). Grâce aux différents lasers, le système de cytométrie permet de réaliser des marquages de MVs avec des fluorophores lipophiles ou des anticorps fluorescents dirigés contre des antigènes présents à la surface des vésicules. Le marquage fluorescent des vésicules offre la possibilité d'exclure les particules non vésiculaires des analyses et permet également d'étudier des sous-populations vésiculaires (Tableau 8) (Morales-Kastresana and Jones, 2017).

Enfin, les méthodes de microscopie électronique sont les méthodes les plus utilisées afin de visualiser les MVs. En particulier, les approches de microscopie électronique à transmission constituent le « gold standard » et permettent de caractériser la morphologie des vésicules avec une très haute résolution (Anderson *et al.*, 2013; Linares *et al.*, 2017). La microscopie à force atomique (AFM) est un outil moins utilisé qui offre également une très haute résolution (Sharma *et al.*, 2018). Toutefois comme la microscopie électronique à balayage, l'AFM permet « d'observer » la surface des particules, ce qui rend difficile la distinction entre les MVs et les particules non vésiculaires (Tableau 8).

Tableau 8 Comparaison des méthodes les plus couramment utilisées pour analyser les propriétés physiques des vésicules membranaires.

Méthodes	Avantages	Limites et inconvénients	Quantification	Taille
Détection d'impulsion résistive ajustable (TRPS, Tunable Resistive Pulse Sensing)	-Convient à l'analyse d'échantillons polydisperses -Très bonne estimation de la concentration en particules -Haute résolution	-Nécessite de déterminer le "bon" facteur de dilution -Ne permet pas de distinguer entre MVs et particules non vésiculaires -Possible blocage des pores par de grandes particules	Oui	40 nm-20 µm (dépend de la taille des pores)
Cytométrie en flux (FCM, Flow CytoMetry)	-Détection spécifique des MVs (Marquage des membranes par fluorescence) -Multiple marquage possible -Rapide -Analyse de la concentration (nFCM)	-Ne permet pas la détection des particules de moins de 200 nm sur la plupart des cytomètres de flux	Oui	FCM: 200 nm-50 µm nFCM: 40 nm-1000 nm
Nano-cytométrie en flux (nFCM, nano Flow CytoMetry)	-Rapide -Analyse de la concentration (nFCM)			
Analyse du suivi individuel de nanoparticules (NTA, Nanoparticle Tracking Analysis)	-Visualisation des particules -Marquage des membranes par fluorescence possible (Détection spécifique des MVs)	-Nécessite de déterminer le "bon" facteur de dilution -Ne permet pas de distinguer entre MVs et particules non vésiculaires	Oui	30 nm-600 nm
Diffusion dynamique de la lumière (DLS, Dynamic Light Scattering)	-Mesure d'une large gamme de particules (DLS, MADLS) -Rapide (DLS, MADLS) -Convient à l'analyse d'échantillons polydisperses (MADLS)	-Nécessite de déterminer le "bon" facteur de dilution (DLS, MADLS) -Ne permet pas de distinguer entre MVs et particules non vésiculaires (DLS, MADLS) -Ne convient pas à l'analyse d'échantillons polydisperses (DLS) -La présence de grosses particules biaise les résultats (DLS)	Non	1 nm-10 µm
DLS multi-angle (MDLS, Multi-angle DLS)				
Sédimentation centrifuge différentielle (DCS, Differential Centrifugal Sedimentation ou Centrifugal Liquid Sedimentation)	-Mesure d'une large gamme de particules -Convient à l'analyse d'échantillons polydisperses. -Haute résolution	-Ne permet pas de distinguer entre MVs et particules non vésiculaires	Non	20 nm-50 µm
Microscope à force atomique (AFM, Atomic Force Microscopy)	-Très haute résolution -Visualisation des particules -Visualisation de la surface des particules	-Analyses longues -Nécessite une expertise technique -Préparation d'échantillon difficile -Ne permet pas de distinguer entre MVs et particules non vésiculaires	Non	1 nm-1000 nm
Microscope électronique à transmission (TEM) Microscope électronique à balayage (MEB)	-Très haute résolution (MET, MEB) -Visualisation de la morphologie des MVs (MET, MEB)	-Analyses longues (MET, MEB) -Nécessite une expertise technique (MET, MEB) -Préparation d'échantillon difficile (MET, MEB) -Ne permet pas de distinguer entre MVs et particules non vésiculaires (MEB)	Non	1 nm-1 µm

## 1.2.4 Nouvelles avancées et défis techniques liés à l'étude des MVs

### 1.2.4.1 Approche de purification par triage en cytométrie en flux

Selon le type d'analyses réalisées, différents niveaux de pureté des fractions vésiculaires sont nécessaires. En particulier, il est préférable d'analyser la taille et la composition des vésicules avec des fractions les plus pures possible. En effet, les caractérisations physico-chimiques des vésicules constituent une étape importante qui permet de faire des hypothèses sur les mécanismes de biogenèse et les potentiels rôles joués par ces vésicules.

Afin d'augmenter la pureté des fractions vésiculaires, une approche de triage des MVs par cytométrie en flux à haute performance a récemment été proposée (Nasukawa *et al.*, 2021). Dans ce travail, les MVs des bactéries à Gram positif *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* sont d'abord purifiées par centrifugation différentielle et séparation sur gradient de densité. Les membranes des vésicules sont ensuite marquées par un marqueur fluorescent lipophile et les particules non fluorescentes sont écartées par triage en cytométrie en flux. Les paramètres de triage et la qualité des fractions vésiculaires avant et après triage sont présentés dans la Fig. 30A-B. Étonnement, on observe que moins de 20 % des particules contenues dans les fractions vésiculaires sont fluorescentes après purification par ultracentrifugation différentielle et gradient de densité. Des résultats similaires ont également été décrits pour des préparations de vésicules eucaryotes (George *et al.*, 2021). De manière intéressante, cette approche de purification proposée par Nasukawa *et al.* (2021) couplant les méthodes classiques de purification à la cytométrie en flux permet de passer de 20 à près de 80 % de particules fluorescentes ce qui permet d'augmenter la pureté des préparations par 4. On peut notamment observer figure 30C que le profil protéique 2D des échantillons purifiés par triage en cytométrie en flux est fortement impacté par l'exclusion des particules non fluorescentes. Cette nouvelle approche de purification par triage de particules fluorescentes semble particulièrement pertinente pour les applications nécessitant une très grande pureté des fractions vésiculaires, telles que les études protéomiques, métagénomiques ou lipidomiques.

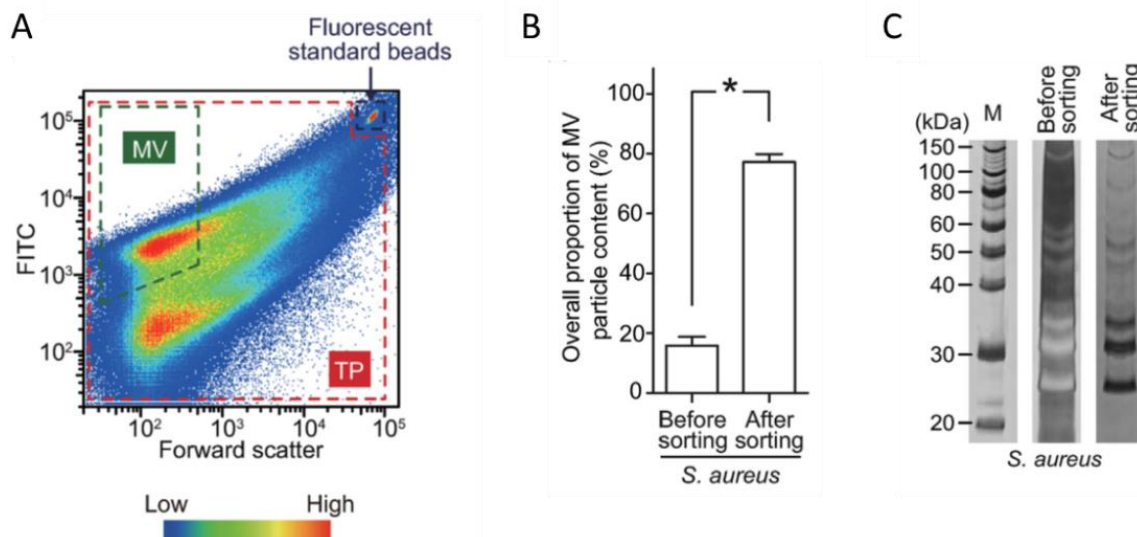


Fig. 30 Analyse par cytométrie en flux de la proportion de particules fluorescentes dans une fraction vésiculaire de *Staphylococcus aureus* obtenue par ultracentrifugation sur gradient de densité. (A) Les zones de sélection (ou « gating area ») des particules fluorescentes (MV) et des particules totales (TP) sont entourées de lignes pointillées vertes et rouges, respectivement. Les billes fluorescentes de 7  $\mu\text{m}$  sont indiquées en pointillés noirs. Les fractions vésiculaires ont été traitées avec un marqueur fluorescent spécifique des membranes lipidiques (DiO). (B) Comparaison de la proportion de particules fluorescentes avant et après le triage. (C) Profils protéiques des fractions vésiculaires obtenues avant et après triage. Les fractions ont été séparées sur gels SDS-PAGE et colorées à l'argent. Issues de Tadahiro Nasukawa *et al.*, 2021.

#### 1.2.4.2 Méthodes d'analyse de la taille et de la concentration

La performance des appareils permettant d'estimer la taille et la concentration des MVs ont récemment fait l'objet de plusieurs études comparatives. Ces travaux mettent en évidence un certain nombre de limites qui doivent être prises en compte lors de l'interprétation des résultats. De plus, ces travaux offrent une meilleure visibilité sur les méthodes les plus adaptées à la nature des échantillons à étudier.

Dans des travaux de 2021, les performances du NTA, du DCS, du TRPS et du nFCM ont été étudiées de manière approfondie par l'analyse de billes de polystyrène de tailles comprises entre 60 et 240 nm de diamètre (Fig. 31A-B) (Vogel *et al.*, 2021). La figure 31A présente une comparaison de la mesure de la taille des billes (100, 150, 200 et 240 nm) analysées séparément (cf. condition monomodale). À l'inverse, la figure 31B présente le résultat obtenu par les différents appareils lorsque des billes de 60, 100 et 150 nm sont analysées en même temps avec un ratio 1 : 1 : 1 (cf. condition multimodale). Dans la condition monomodale, la distribution des tailles mesurées est satisfaisante pour les 4 méthodes. Ces résultats montrent toutefois que le DCS sous-estime la taille des particules de 10 à 15 nm de diamètre en moyenne. Dans la condition multimodale, le TRPS et le nFCM détectent les billes de 60 nm de diamètre contrairement au NTA et au DSC. Par ailleurs, la distribution des tailles mesurées et la quantité des 3 populations de billes (1 : 1 : 1) sont satisfaisantes pour le TRPS et le nFCM. Comme précédemment, on observe que le DCS sous-estime la taille des particules de 10 à 15 nm de diamètre. Enfin, bien que la distribution des tailles mesurées soit satisfaisante, le NTA sous-estime la quantité des billes mesurant 100 nm et surestime la quantité des billes de 150 nm. Ce phénomène a été décrit

dans plusieurs autres travaux (Dehghani *et al.*, 2021; Terejanszky *et al.*, 2019). En particulier, dans les figures 31C et D, les auteurs ont analyse au NTA des billes de 50 et 100 nm ou 50 et 200 nm, dans un ratio 1 : 1. On observe que la concentration des billes de 50 nm est sous-estimée en présence de billes de 100 nm. Cette sous-estimation augmente en présence de billes de 200 nm. Par ailleurs, les auteurs montrent que moins de 5 % de particules de 100 et 200 nm sont suffisantes pour que la quantité de particules de 50 nm soit sous-estimée. L'impact des particules de grandes tailles sur la quantification des particules de 50 nm devient négligeable lorsqu'elles représentent moins de 2,5 % des particules totales de l'échantillon (Dehghani *et al.*, 2021).

Ces travaux sont particulièrement pertinents pour l'étude des vésicules dont la taille est comprise entre 20 et 400 nm de diamètre. Pour des échantillons très hétérogènes, le TRPS et le nFCM sont à privilégier, aussi bien pour estimer la taille que la concentration des fractions vésiculaires.

Le NTA et le DCS sont des approches qui peuvent être utilisées pour des échantillons monodisperses avec une distribution très homogène. Enfin, le nFCM et le NTA-fluorescent permettent d'exclure les particules non vésiculaires des analyses grâce à des marquages fluorescents spécifiques. Ce dernier point constitue un avantage déterminant dans le cas de l'analyse d'échantillons de faible pureté.

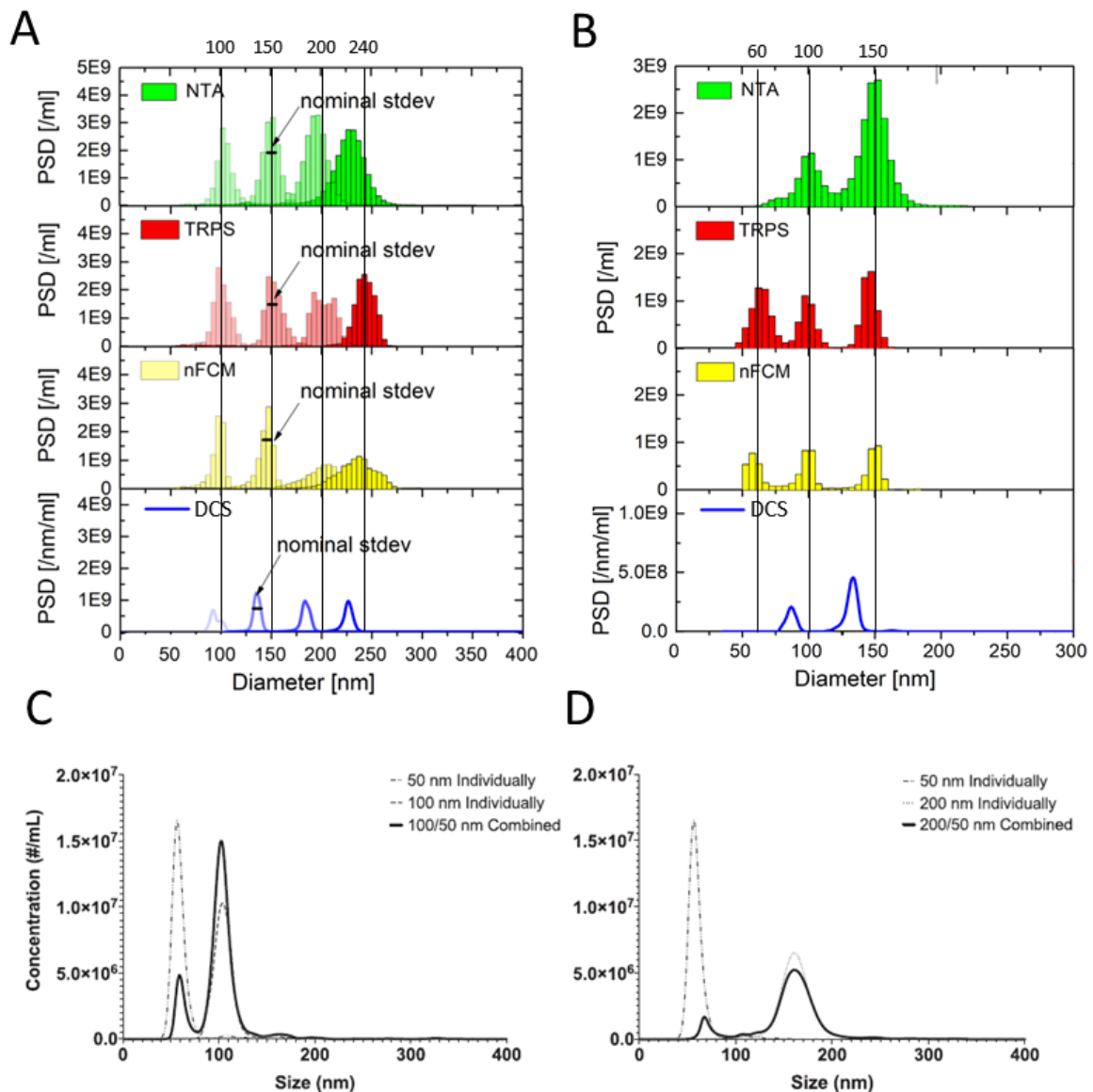


Fig. 31 Comparaison de la performance des appareils communément utilisés pour mesurer la quantité et la distribution de nanoparticules. (A) Résultats des mesures aux NTA, TRPS, nFCM et DCS de la taille de différentes billes de polystyrène (100, 150, 200, 240 nm) analysées individuellement. (B) Résultats des mesures aux NTA, TRPS, nFCM et DCS de la taille d'un mélange de billes de polystyrène de tailles différentes (60, 100, 150 nm). (C-D) Quantifications au NTA d'échantillons monodisperse et polydisperse de nanoparticules. Adaptées de Robert Vogel *et al.*, 2021 et Mehdi Dehghani *et al.*, 2021.

## 2. Biogenèse des vésicules membranaires de bactéries

### 2.1 Introduction sur les mécanismes de biogenèse des MVs bactériennes

Contrairement aux bactéries à Gram négatif, l'épaisse paroi rigide recouvrant la membrane cytoplasmique des bactéries à Gram positif constitue une contrainte majeure à la formation et la libération de vésicules. Cette contrainte explique très probablement que la production de vésicules par les bactéries à Gram positif est largement inférieure à celle des bactéries à Gram négatif. Toutefois, malgré la présence de cette épaisse paroi, la production de vésicules a été démontrée chez de nombreuses bactéries telles que les bactéries du genre *Staphylococcus*, *Listeria*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Bacillus* ou encore de nombreux lactobacilles. Il est intéressant de noter que la



composition et l'épaisseur du peptidoglycane sont variables selon les espèces bactériennes. Cette diversité explique très probablement les différences de taille et les différences de quantité de vésicules produites par les bactéries à Gram positif (Navarre and Schneewind, 1999).

Les premières publications abordant clairement la production de MVs par les bactéries à Gram positif remontent à la fin du 20<sup>e</sup> siècle (Dorward and Garon, 1990a; Pollacka, 1992a), soit plus de 20 ans après les premières observations de vésicules produites par la bactérie modèle *Escherichia coli* (Knox *et al.*, 1966; Work *et al.*, 1966; Chatterjee and DAS, 1967; Sonntag *et al.*, 1978). Ce désintérêt peut s'expliquer par le fait que la production de MVs par les bactéries à Gram positif est longtemps apparue comme contre intuitive en raison de la présence de l'épaisse paroi bactérienne. De plus, la faible production de vésicules en comparaison aux bactéries à Gram négatif constitue une limite importante pour l'identification et l'analyse de MVs de bactéries à Gram positif.

À ce jour, divers mécanismes de biogenèse des MVs ont pu être identifiés aussi bien chez les bactéries à Gram négatif que chez les bactéries à Gram positif. Contrairement aux hypothèses initialement avancées, la production de vésicules met en jeu un certain nombre de mécanismes complexes, et n'est pas uniquement le résultat de la lyse cellulaire des bactéries. Par exemple, chez *Escherichia coli* la production de vésicules n'entraîne pas nécessairement une perte de la viabilité cellulaire ou une perte d'intégrité membranaire (McBroom *et al.*, 2006). De même, la production de vésicules par *Lactococcus lactis* est en partie liée à la libération chronique de capsides phagiques qui n'entraîne pas de lyse cellulaire (Liu *et al.*, 2022a).

## **2.2 Biogenèse des MVs de bactéries à Gram négatif**

### **2.2.1 Réduction des interactions entre la membrane externe et le peptidoglycane**

Certaines protéines périplasmiques maintiennent la stabilité de l'enveloppe des bactéries à Gram négatif en formant des interactions covalentes et non covalentes avec les membranes et le peptidoglycane. Ainsi, une diminution du nombre de ces interactions entraîne un décollement de la membrane externe favorisant le bourgeonnement des vésicules alors appelées OMVs (Fig. 23 et Fig. 32A).

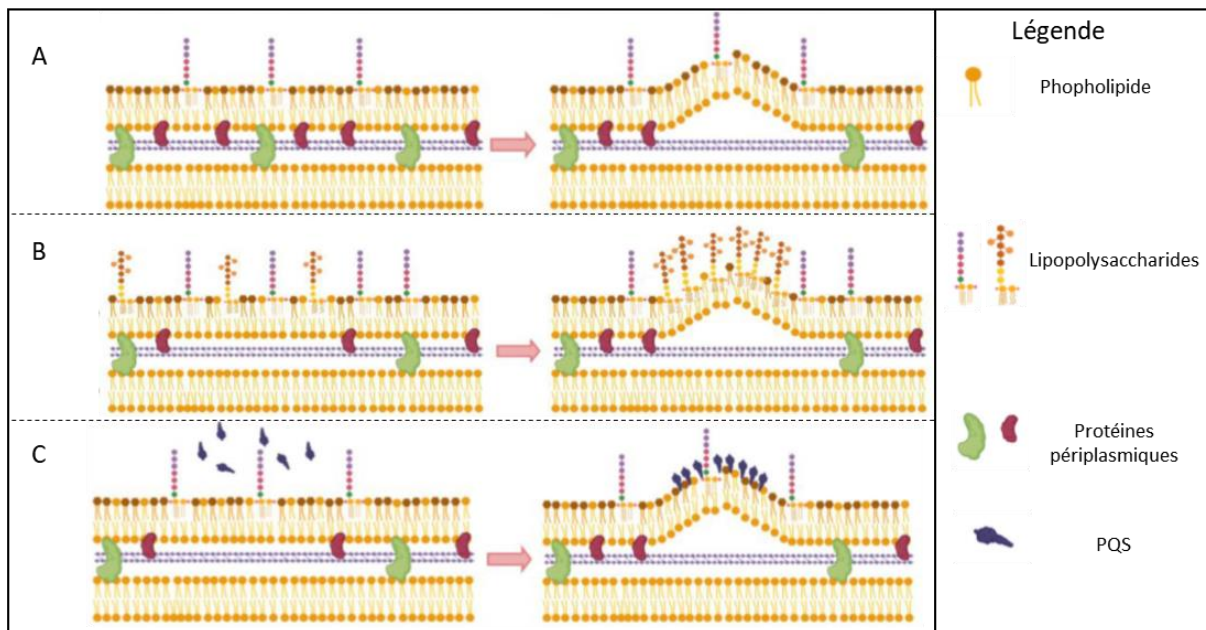


Fig. 32 Mécanismes de biogenèse des vésicules membranaires de bactéries à Gram négatif. Adaptée de Mariana G. Sartorio *et al.*, 2021.

En particulier, l'interruption locale des liaisons entre le PG et la membrane externe est un phénomène qui se produit lors de la multiplication des bactéries au niveau du septum de division. Des bourgeonnements de vésicules au septum de division ont pu être observés en MET chez plusieurs bactéries telles que *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* ou encore *Acinetobacter baumannii* (Burdett and Murray, 1974; Deatherage *et al.*, 2009; Koning *et al.*, 2013).

Les lipoprotéines de Braun (Lpp) sont des protéines associées à la membrane externe par une ancre lipidique dont l'expression régule fortement la production de vésicules. En effet, les Lpp fournissent les seules liaisons covalentes entre la membrane externe et le peptidoglycane sous-jacent. De plus, elles sont abondantes et réparties de manière homogène dans la membrane externe (Mathélié-Guinlet *et al.*, 2020). Plusieurs travaux ont montré qu'une diminution de la quantité de Lpp conduit à une forte augmentation de la production de vésicules (Sonntag *et al.*, 1978; Suzuki *et al.*, 1978; Deatherage *et al.*, 2009; Schwechheimer *et al.*, 2015). Par ailleurs, cette production accrue de vésicules n'entraîne pas une augmentation de la lyse cellulaire (McBroom *et al.*, 2006). Réciproquement, l'augmentation du nombre de Lpp conduit à une réduction de la production de OMVs (Schwechheimer *et al.*, 2014). Chez *Escherichia coli*, les liaisons covalentes entre les Lpp et le peptidoglycane sont catalysées par des transpeptidases telles que YcfS, YbiS et ErfK. Ainsi, la mutation des gènes codant ces transpeptidases conduit de manière indirecte à une forte augmentation de la production de vésicules (Schwechheimer and Kuehn, 2013).

De nombreuses autres protéines assurant l'interaction membranes-peptidoglycane ont également été identifiées pour leur rôle dans la production d'OMVs.

La protéine OmpA (outer-membrane protein A) est une porine transmembranaire localisée dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif qui interagit de manière non covalente avec le peptidoglycane (Schwechheimer and Kuehn, 2015). Comme pour les Lpp, il a été observé que la mutation du gène codant OmpA est associée à un phénotype d'hypervésiculation (Sonntag *et al.*, 1978; Song *et al.*, 2008; Deatherage *et al.*, 2009; Moon *et al.*, 2012).

Le complexe de division cellulaire Tol-pal (peptidoglycan-associated lipoprotein) est un complexe préférentiellement localisé aux pôles des bactéries qui assure une liaison entre le PG et les deux membranes bactériennes (Yeh *et al.*, 2010). Des mutants déficients en Tol-pal ont également été associés à une augmentation de la production de vésicules (Bernadac *et al.*, 1998).

De même, des protéines de pilus, de pompe à efflux, et des protéines interagissant à la fois avec le peptidoglycane et les membranes ont été associées à la production d'OMVs chez diverses bactéries à Gram négatif telles que *Neisseria meningitidis* ou encore *Salmonella Typhimurium* (Deatherage *et al.*, 2009; Lappann *et al.*, 2013).

### **2.2.2 Motilité bactérienne : rôle des flagelles**

Les flagelles enveloppés (ou périplasmiques) des bactéries à Gram négatif sont des structures protéiques formées de 3 unités principales ; un rotor qui traverse l'enveloppe cellulaire, un crochet et un filament enveloppé par la membrane externe. Notons que l'assemblage des flagelles enveloppés met en jeu une synchronisation complexe entre la synthèse de la membrane externe et la synthèse du filament protéique (Z. Qin *et al.*, 2017). La présence de bourgeonnements vésiculaires le long des flagelles enveloppés est couramment observée et suggère que la libération de vésicules médiée par les flagelles pourrait être un mécanisme commun aux bactéries flagellées (Fig. 23) (Z. Qin *et al.*, 2017). Notamment, la libération des vésicules lors de la rotation du flagelle a été observée chez plusieurs bactéries telles *Aliivibrio fischeri* et *Vibrio cholerae* (Aschtgen *et al.*, 2016 ; Brennan *et al.*, 2014).

### **2.2.3 Accumulation d'agrégats cellulaires dans le périplasme**

De nombreux travaux montrent que l'accumulation de peptidoglycane et de protéines mal conformées dans le périplasme entraîne des déformations de la membrane externe favorisant ainsi la production d'OMVs (Fig. 23) (McBroom and Kuehn, 2007; Schwechheimer *et al.*, 2014; Tashiro *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 1998). Notamment chez *Porphyromonas gingivalis*, l'accumulation de peptidoglycane due à la mutation du gène codant une autolysine, s'accompagne de l'augmentation de la production d'OMVs (Hayashi *et al.*, 2002 ; Zhou *et al.*, 1998). De même, la mutation de gènes codant des protéases périplasmiques entraîne une forte production d'OMVs par *Shewanella oneidensis* (Ojima *et al.*, 2017). Dans ce contexte, il a été suggéré que l'accumulation de composants toxiques dans le périplasme et leur libération dans le milieu extracellulaire constituent un mécanisme de détoxification permettant ainsi d'augmenter la survie des bactéries (McBroom and Kuehn, 2007; Schwechheimer and Kuehn, 2013).

### **2.2.4 Perte d'intégrité de la paroi cellulaire**

La perte d'intégrité de la paroi cellulaire des bactéries à Gram négatif est connue pour provoquer la production de vésicules (Fig. 23).

L'analyse de la composition des vésicules de nombreuses bactéries montre la présence de divers composés de la membrane interne et du cytoplasme (Kadurugamuwa and Beveridge, 1995; Renelli *et al.*, 2004). Initialement ignorée, il a été montré que la présence de matériel cytoplasmique dans les vésicules est due à des phénomènes de lyse cellulaire et de ruptures localisées du peptidoglycane.

Lorsque la paroi est très endommagée, la lyse des bactéries entraîne une libération de vésicules appelées OIMV et EOMV présentant une composition différente de celle des OMVs issues du bourgeonnement de la membrane externe. Les OIMV (Outer-inner membrane vesicles) sont des vésicules qui présentent deux membranes, l'une provenant de la membrane cytoplasmique et l'autre

de la membrane externe des bactéries (Devos *et al.*, 2017; Dobro *et al.*, 2017; Pérez-Cruz *et al.*, 2015, 2013). Les EOMV présentent quant à elles une seule membrane de composition variable. En effet, il a été montré que les deux membranes délimitant les IOMV peuvent fusionner pour former une vésicule qui est alors identifiée comme une EOMV (Koning *et al.*, 2013).

Par exemple, l'induction de la lyse cellulaire de *Stenotrophomonas maltophilia* par un traitement antibiotique est accompagnée d'une augmentation importante de la proportion d'OIMV libérées par les bactéries (Devos *et al.*, 2017). De même, l'induction d'un prophage cryptique de *Pseudomonas aeruginosa* par de la mitomycine a été décrite comme un facteur majeur de la production de vésicules (Turnbull *et al.*, 2016a). Dans ce travail, les auteurs ont montré que suite à l'activation de l'expression du système holin-endolysin du phage, la dégradation de la paroi entraîne une lyse cellulaire dite explosive provoquant la libération de vésicules.

Bien que la proportion d'IOMV est très variable selon les espèces, les OMVs représentent néanmoins la majorité des MVs produites par les bactéries étudiées à ce jour. Les IOMVs représentent près de 0,1 % des vésicules produites par *Shewanella vesiculosa* et jusqu'à 49 % des vésicules produites par *Pseudoalteromonas marina* (Hagemann *et al.*, 2014; Pérez-Cruz *et al.*, 2015).

La libération de IOMVs par les bactéries à Gram négatif a également été associée à des ruptures non lytiques, localisées et transitoires du peptidoglycane. Notamment, les stress antibiotiques ou l'action des hydrolases du peptidoglycane des bactéries (autolysines) peuvent entraîner la production de vésicules suite à l'altération du peptidoglycane, sans induire de lyse cellulaire (Kadurugamuwa and Beveridge, 1995; Pérez-Cruz *et al.*, 2013; Clarke, 2018).

### 2.2.5 Rôle des molécules du quorum sensing

Des molécules de quorum sensing libérées par plusieurs bactéries ont été impliquées dans la production d'OMVs (Fig. 23 et Fig. 32).

Il a notamment été montré que la molécule de quorum sensing appelée PQS (*Pseudomonas* Quinolones Signal) produite par *Pseudomonas aeruginosa* favorise la production de vésicules en s'accumulant dans le feuillet externe des membranes bactériennes (Florez *et al.*, 2017; Mashburn and Whiteley, 2005; Schertzer and Whiteley, 2012; Wessel *et al.*, 2013). En effet, les molécules de PQS agissent en chélatant les cations divalents nécessaires à la stabilisation des charges négatives portées par les LPS. Ainsi, l'accumulation de charges négatives dans le feuillet externe des membranes entraîne une courbure qui favorise le bourgeonnement membranaire (Mashburn-Warren *et al.*, 2008). De manière intéressante, les PQS favorisent également la formation de vésicules en absence de LPS mais les mécanismes mis en jeu restent encore à identifier. En particulier, la production de vésicules par l'activité des molécules de PQS a été décrite chez de nombreuses bactéries à Gram positif (Tashiro *et al.*, 2010a), sur des érythrocytes (Schertzer and Whiteley, 2012) ainsi que sur des liposomes dépourvus de LPS (Mashburn-Warren *et al.*, 2008).

De même, d'autres molécules de quorum sensing telles que les DSF (diffusible signal system) ont également été associées à l'augmentation de la production de vésicules par des bactéries à Gram négatif (Devos *et al.*, 2015, p. 21).

## 2.2.6 Rôle de lipides membranaires

### Symétrie entre les feuillettes lipidiques des membranes bactériennes

L'ABC transporteur VacJ/Yrb exprimé par *Haemophilus influenzae* est un transporteur de lipides qui permet le maintien d'une concentration lipidique équilibrée entre les deux feuillettes de la membrane externe de *H. influenzae*. Les travaux de Roier *et al.* (2016) ont montré que la mutation des gènes codant VacJ/Yrb ou la répression de leur expression s'accompagne d'une accumulation de lipides dans le feuillet externe de la membrane externe entraînant ainsi une courbure qui favorise la production de OMVs par bourgeonnement. (Roier *et al.*, 2016a, 2016b).

Le transporteur VacJ/Yrb est conservé chez de nombreuses bactéries à Gram négatif. Notamment, des observations similaires ont été réalisées chez *Vibrio cholerae* suite à la mutation de gènes codant des homologues de VacJ et Yrb (Zingl *et al.*, 2020).

Plus largement, ce mécanisme démontre l'implication de la symétrie entre les deux feuillettes des membranes bactériennes dans la formation des OMVs (Fig. 33).

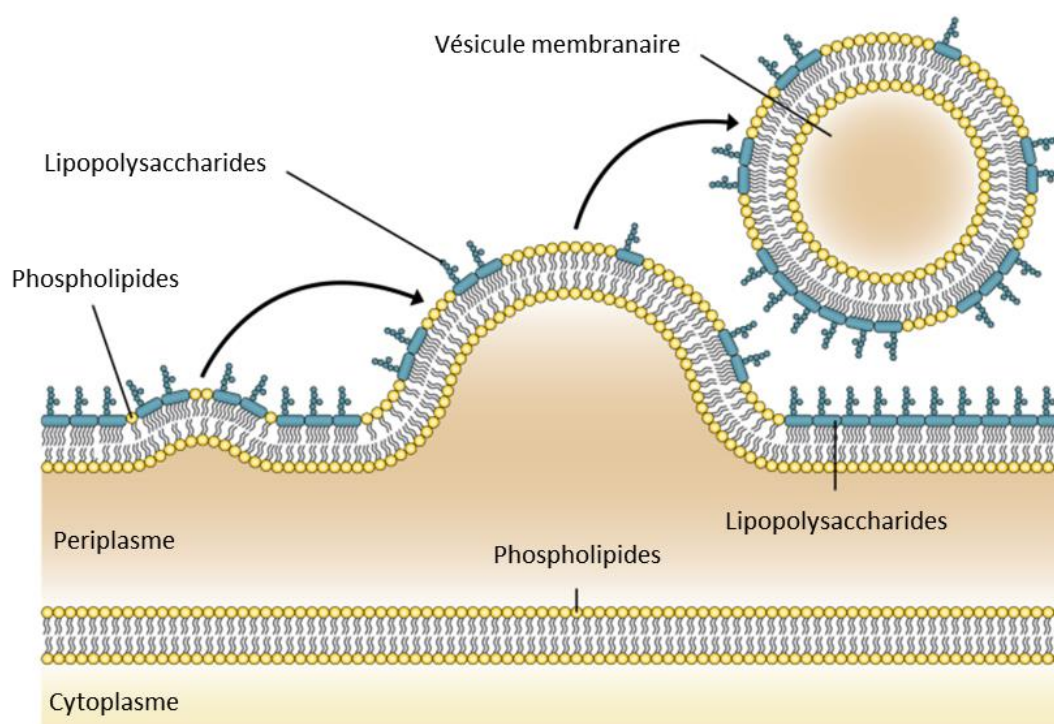


Fig. 33 Mécanisme de biogenèse des vésicules membranaires de bactéries à Gram négatif. L'accumulation de phospholipides dans le feuillet externe de la membrane externe engendre un bourgeonnement qui aboutit à la formation de vésicules membranaires. Adaptée de Sandro Roier *et al.*, 2016.

### Influence des lipopolysaccharides (LPS)

La bactérie *Pseudomonas aeruginosa* présente deux types de LPS dans sa membrane externe ; des LPS neutres et des LPS chargés négativement que l'on retrouve majoritairement dans les OMVs. Comme expliqué précédemment, l'accumulation de charges négatives dans le feuillet externe des membranes externes entraîne des forces de répulsion qui favorisent la formation des OMVs par bourgeonnement (Kadurugamuwa and Beveridge, 1995). Ainsi, il a été montré que des bactéries mutantes n'exprimant

que des LPS neutres produisent des OMVs de petite taille et de composition très différente par rapport aux OMVs libérées par les bactéries WT. À l'inverse, les OMVs libérées par les mutants n'exprimant que des LPS chargés négativement ont une composition relativement similaire aux OMVs libérées par les bactéries WT (Fig. 32) (Murphy *et al.*, 2014). De manière intéressante, ces résultats montrent également que la composition en LPS des membranes influence la taille et la nature des cargos présents dans les OMVs.

En plus de la charge, des modifications des LPS peuvent affecter la courbure de la membrane externe (Fig. 32). En effet, chez *Salmonella Typhimurium* la désacylation du lipide A par la protéine PagL se traduit par un enrichissement de LPS désacylés dans les OMVs et une augmentation importante de la production de vésicules (Elhenawy *et al.*, 2016). Conformément, la mutation du gène *pagL* entraîne une forte diminution de la production des vésicules.

Dans ce contexte, il a été proposé que la production de vésicules constitue un mécanisme permettant de débarrasser la membrane externe des LPS dégradés ou d'autres éléments affectant la survie bactérienne (Bonnington and Kuehn, 2016; Zingl *et al.*, 2020).

La nature et la charge des types de LPS présents dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif contribuent à la formation d'OMVs.

### **Fluidité et composition lipidique des membranes**

Un certain nombre de travaux établissent un lien entre composition lipidique des vésicules, fluidité des membranes et biogénèse. Toutefois, les nombreux résultats contradictoires rendent difficiles l'interprétation et la généralisation des observations.

Par exemple, il a été montré que les OMVs libérées par *Pseudomonas syringae* présentent des acides gras polyinsaturés et des acides gras à chaînes ramifiées qui sont connus pour augmenter la fluidité membranaire (Kulkarni *et al.*, 2014; Nichols and Russell, 1996). Les auteurs suggèrent ainsi que l'augmentation de la fluidité des membranes due à la présence de ces acides gras dans les membranes pourrait favoriser la formation de vésicules. Toutefois, il a également été observé que les OMVs libérées par *Pseudomonas aeruginosa* sont enrichies en acides gras saturés et en acides gras à longues chaînes qui sont connus pour rigidifier les membranes (Tashiro *et al.*, 2011). Ce résultat suggère au contraire que la fluidité membranaire n'est pas un facteur important de la production des vésicules.

De même, l'influence de la température sur la fluidité membranaire et son impact sur la biogénèse également sont contradictoires. Des travaux menés sur de nombreuses espèces bactériennes montrent une corrélation entre l'augmentation de la température et la production de vésicules (Frias *et al.*, 2010; McBroom and Kuehn, 2007; McMahon *et al.*, 2012; Roden *et al.*, 2012). Cependant, la production de vésicules par d'autres bactéries ne semble pas affectée par les variations de température (MacDonald and Kuehn, 2013).

### **2.2.7 Contrôle génétique de la production des MVs**

À ce jour, aucun mécanisme génétique partagé par l'ensemble des bactéries à Gram négatif n'a été identifié. Un certain nombre de gènes impliqués dans la production des vésicules a pu être identifié (Kulp *et al.*, 2015), cependant les mécanismes restent limités aux espèces ou souches bactériennes étudiées.

## 2.3 Biogenèse des MVs de bactéries à Gram positif

La majorité des connaissances sur la production de vésicules bactériennes sont issues de l'étude des bactéries à Gram négatif. La biogenèse des MVs de bactéries à Gram positif reste un processus encore mal compris bien que plusieurs mécanismes de production aient été mis en évidence au cours de ces 10 dernières années (Fig. 24).

### 2.3.1 Pression de turgescence

Comme pour les bactéries à Gram négatif, la pression de turgescence exercée par le cytoplasme sur la membrane cytoplasmique est un mécanisme crucial pour la formation et la libération des vésicules de bactéries à Gram positif. En effet, la pression de turgescence permet le bourgeonnement des membranes lorsque l'intégrité des parois est compromise. Des travaux menés sur *Staphylococcus aureus* ont montré que la réduction de la pression de turgescence due à l'augmentation d'osmolarité de l'environnement, conduit à une réduction importante de la production de vésicules (Schlatterer *et al.*, 2018).

### 2.3.2 Intégrité de la paroi cellulaire

Chez les bactéries à Gram positif, l'intégrité du peptidoglycane est un élément clé des processus de biogenèse. La synthèse du peptidoglycane met en jeu des régulations complexes assurant un équilibre entre synthèse et dégradation afin de permettre la croissance et la multiplication des bactéries. Elle est assurée par de nombreuses protéines, notamment des transpeptidases et des hydrolases du peptidoglycane respectivement.

L'importance du rôle joué par les enzymes du peptidoglycane est suggérée par la présence de nombreuses hydrolases du peptidoglycane (ex. autolysines) et de transpeptidases dans les MVs de nombreuses bactéries telles que *Staphylococcus aureus* (Lee *et al.*, 2009), *Streptococcus pneumoniae* (Olaya-Abril *et al.*, 2014), *Streptomyces coelicolor* (Faddetta *et al.*, 2022), *Listeria monocytogenes* (J. H. Lee *et al.*, 2013), *Bacillus anthracis* (Rivera *et al.*, 2010), *Streptococcus* group A (Resch *et al.*, 2016) ou encore les lactobacilles (Domínguez Rubio *et al.*, 2017; Kurata *et al.*, 2022; Dean *et al.*, 2019). Bien que la seule présence de ces enzymes ne constitue pas une démonstration rigoureuse, elle montre malgré tout que ces protéines sont présentes au lieu de formation des vésicules et suggère ainsi un rôle dans leur biogenèse.

Aujourd'hui, il apparaît clair qu'une réduction plus ou moins localisée du nombre de ponts peptidiques établis entre les tetrapeptides liant les chaînes de disaccharides (ou réticulation du peptidoglycane) est nécessaire à la production de vésicules. Cette réduction peut être due à l'action d'enzymes de dégradation ou bien à une réduction de l'activité de synthèse de la paroi (Fig. 24).

### Défaut de synthèse du peptidoglycane

Le rôle de la réticulation du peptidoglycane dans la production de vésicules a été mis en évidence par des traitements avec des antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi et par la mutation de gènes codant des transpeptidases (Fig. 24) (Wang *et al.*, 2018; Andreoni *et al.*, 2019). Ainsi, il a été montré que la déstabilisation du peptidoglycane de *Staphylococcus aureus* entraîne une forte augmentation de la production de vésicules. De même, il a été observé que le traitement de *L. casei* par des

concentrations sublétales de bêta-lactames entraîne une forte production de vésicules (Pollacka, 1992b).

### **Dégradation du peptidoglycane**

La dégradation du peptidoglycane par des hydrolases du peptidoglycane (ex. autolysines ou endolysines) est un autre mécanisme important impliqué dans la biogénèse des vésicules de bactéries à Gram positif. Les autolysines sont un type d'hydrolase du peptidoglycane exprimées par les bactéries. Ces enzymes sont impliquées dans le catabolisme du peptidoglycane et peuvent induire la lyse cellulaire lorsque leur expression n'est pas régulée (Vollmer *et al.*, 2008). On les distingue des endolysines qui sont des hydrolases du peptidoglycane exprimées par les phages en fin de cycle lytique. Les endolysines permettent ainsi la lyse bactérienne nécessaire à la libération des particules virales (Cahill and Young, 2019).

Les travaux de Toyofuku *et al.* (2017) chez *Bacillus subtilis* ont démontré que la dégradation localisée du peptidoglycane par une endolysine phagique, permet le bourgeonnement de la membrane à travers des perforations de la paroi. Contrairement aux bactéries à Gram négatif, les auteurs ont observé que les bacilles conservent leur morphologie malgré les dégradations de la paroi. De plus, la libération des endolysines dans le milieu extracellulaire favorise également la production de vésicules par les bactéries environnantes (Toyofuku *et al.*, 2017a).

L'implication des endolysines phagiques dans la production de vésicules a également été observée chez *Lactococcus lactis* (Liu *et al.*, 2022b, 2022a) et *Staphylococcus aureus* (Andreoni *et al.*, 2019). Dans tous les exemples précédents, il est intéressant de noter que l'expression des endolysines et la production des vésicules qui en résulte est sous le contrôle des systèmes de régulation des séquences phagiques. Dans ce contexte, on peut donc considérer les phages comme un outil permettant l'induction de vésicules par les populations bactériennes.

Le rôle des autolysines dans la production des vésicules bactériennes a récemment été mis en évidence chez *Staphylococcus aureus* (Wang *et al.*, 2018) et *Bacillus subtilis* (Abe *et al.*, 2021). De manière intéressante, il a été montré chez *Bacillus subtilis* que l'induction des autolysines en présence de différents stress entraîne l'augmentation de la production de vésicules (température, carence nutritionnelle et anoxie) (Abe *et al.*, 2021). L'expression inductible des autolysines et la production de vésicules qui en résulte pourrait ainsi avoir des implications majeures dans la survie et l'interaction des bactéries avec leur environnement.

### **Lyse cellulaire**

La contribution de la lyse cellulaire dans la production des vésicules reste encore vague. Cependant, les travaux menés chez les bactéries à Gram négatif suggèrent que la lyse pourrait également jouer un rôle important chez les bactéries à Gram positif. Chez *Bacillus subtilis*, il semblerait que la lyse ne soit pas un mécanisme majoritaire étant donné que les bactéries conservent leur morphologie malgré la dégradation de la paroi (Pospíšil *et al.*, 2020; Toyofuku *et al.*, 2017a). Toutefois, il apparaît que selon les souches de *Bacillus*, la dégradation de la paroi entraîne soit la formation de nanotubes (Pospíšil *et al.*, 2020) soit la libération de vésicules (Toyofuku *et al.*, 2017a). Ces observations suggèrent qu'il existe une forte variabilité entre espèces bactériennes qui pourrait être expliquée par des différences d'épaisseur de la paroi et les différents niveaux de réticulation du peptidoglycane.



### 2.3.3 Molécules impliquées dans la production de MVs

#### Quorum sensing

Comme mentionné précédemment, les molécules du quorum sensing PQS libérées par *Pseudomonas aeruginosa* sont capables d'induire la production de vésicules par des bactéries à Gram positif (Fig. 24) (Tashiro *et al.*, 2010a). Toutefois, le mode d'action mis en jeu dans l'effet des PQS sur les membranes de bactéries à Gram positif reste encore à élucider (Mashburn-Warren *et al.*, 2008).

#### Phenol-Soluble Modulins (PSMs)

Les PSMs sont des peptides amphipathiques de structure hélicoïdale présentant des propriétés similaires aux surfactants. Il a été montré que la mutation de gènes codant des PSMs est associée à une forte réduction de la production de MVs chez *Staphylococcus aureus* (Wang *et al.*, 2018). Le mode d'action des PSMs n'est pas encore entièrement identifié. Toutefois, des travaux suggèrent que les PSMs agissent en désorganisant la membrane et en augmentant la fluidité membranaire, promouvant ainsi la formation de vésicules (Fig. 24) (Schlatterer *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018).

### 2.3.4 Composition lipidique des MVs

La composition lipidique des membranes cytoplasmiques et des MVs de bactéries à Gram positif est généralement similaire (Rivera *et al.*, 2010). Toutefois, certaines différences de composition ont pu être observées chez plusieurs bactéries. Notamment, l'analyse de la composition lipidique de MVs de *Streptococcus pyogenes* montre une accumulation de phosphatidylglycérols et une réduction de cardiolipines en comparaison aux membranes cytoplasmiques (Resch *et al.*, 2016). De même, chez *Propionibacterium acnes*, les MVs présentent un appauvrissement en triacylglycérols (Jeon *et al.*, 2017). La composition lipidique des MVs de *Listeria monocytogenes* diffère significativement de la membrane cytoplasmique avec un enrichissement en phosphatidylethanolamines, sphingolipides et triacylglycérols (Coelho *et al.*, 2019).

L'impact de ces différences sur les propriétés des MVs et leur contribution dans la production de vésicules restent encore à éclaircir. Néanmoins, ces différences pourraient notamment être expliquées par la formation des MVs au niveau de certains domaines de la membrane cytoplasmique. De plus, certains lipides pourraient également être exclus des MVs de manière active ou passive. En effet, il a été montré que les cardiolipines provoquent de fortes déformations des vésicules (Tomšič *et al.*, 2005), ce qui pourrait ainsi expliquer leur absence dans certaines vésicules bactériennes (Resch *et al.*, 2016).

### 2.3.5 Contrôle génétique de la production des MVs

Plusieurs régulateurs génétiques impliqués dans la production de vésicules ont pu être identifiés.

Par exemple, le facteur de transcription de la réponse aux stress sigma B (ou SigB) influence fortement la production de MVs par *Listeria monocytogenes* (J. H. Lee *et al.*, 2013). Il a été montré que le mutant  $\Delta sigB$  produit près de 10 fois moins de MVs que la souche parentale (J. H. Lee *et al.*, 2013). De plus, la forme et la composition protéique des vésicules du mutant sont très différentes de celles produites par les bactéries parentales (J. H. Lee *et al.*, 2013). Étant donné que de nombreuses bactéries à Gram positif possèdent un homologue de SigB, il est possible que son rôle dans la biogenèse des MVs soit partagé chez d'autres bactéries (Hecker *et al.*, 2007).

De même, le système à deux composants CovRS du *Streptococcus* de Group A a été impliqué dans la régulation de la production de MVs (Resch *et al.*, 2016).

Le fait que ces régulateurs globaux contrôlent l'expression de nombreux gènes rend difficile l'identification des mécanismes responsables de la biogenèse des vésicules. Cependant, ils suggèrent également que la production de MVs met en jeu des régulations génétiques complexes.

## 2.4 Invagination et biogenèse des MVs

Plusieurs travaux ont mis en évidence la présence de vésicules intracellulaires chez de nombreuses espèces bactériennes. Les processus mis en jeu dans la formation de ces vésicules et les rôles qu'elles peuvent exercer sont largement inconnus (Dobro *et al.*, 2017). Chez certaines bactéries, il a été proposé que ces vésicules pourraient jouer un rôle de détoxification (Keren *et al.*, 2017) (Eichinger *et al.*, 2014). D'autres travaux menés chez *Gemmata obscuriglobus* suggèrent que ces vésicules puissent avoir un rôle métabolique en permettant l'internalisation et la digestion de protéines issues du milieu extracellulaire (Acehan *et al.*, 2014; Lonhienne *et al.*, 2010).

## 2.5 Régulation de la biogenèse des MVs

### 2.5.1 Production constitutive

D'après certains auteurs, il existerait une production basale de vésicules soumise à aucune régulation. Cette production serait une caractéristique fondamentale de la croissance des bactéries, liée à l'activité normale des cellules et à la nature fluide des membranes lipidiques (McBroom *et al.*, 2006). Cette hypothèse est appuyée par le fait qu'à ce jour, aucun mutant ne produisant pas de MVs n'a pu être identifié (Kulp *et al.*, 2015; McBroom *et al.*, 2006). De plus, de nombreux articles montrent que les bactéries libèrent des vésicules même en absence de stress, notamment au cours de la phase de croissance exponentielle (Mug-Opstelten and Witholt, 1978; Pérez-Cruz *et al.*, 2021; Tashiro *et al.*, 2010b). Cette production est très probablement due à des pertes localisées et transitoires de l'intégrité de la paroi, en raison du remodelage subi par le peptidoglycane au cours des divisions cellulaires (Deatherage *et al.*, 2009).

### 2.5.2 Impact de l'environnement sur la production de MVs

Les mécanismes de régulation de la biogenèse des MVs sont encore peu caractérisés et la majorité des connaissances actuelles proviennent de l'étude de bactéries à Gram négatif.

La production de MVs par les bactéries est le résultat d'une combinaison de facteurs génétiques et environnementaux (Deatherage and Cookson, 2012). En particulier, l'exposition à divers stress est un facteur impactant fortement la production de vésicules (Abe *et al.*, 2021; MacDonald and Kuehn, 2013). De plus, la communication inter et intra espèces joue également un rôle chez les bactéries à Gram négatif et à Gram positif (Mashburn-Warren *et al.*, 2008; Tashiro *et al.*, 2010a).

## Phages et prophages

L'induction de la réponse SOS en présence de stress (ex. antibiotique, ROS, UV) est associée à la production de vésicules chez de nombreuses bactéries (Devos *et al.*, 2017; Gamalier *et al.*, 2017). Dans le cas des bactéries lysogènes, l'activation du système SOS induit l'entrée des prophages dans le cycle de vie lytique, favorisant ainsi la production de vésicules (Baeza *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2022 b; Turnbull *et al.*, 2016). La lyse induite par les phages est un phénomène connu depuis plus d'un demi-siècle, mais son implication dans la formation des vésicules membranaires est quant à elle relativement récente. En raison de l'abondance de phages et de prophages dans les écosystèmes (Mann, 2005; Rezaei Javan *et al.*, 2019), il est fort probable que la lyse induite par les phages soit l'un des principaux mécanismes

contribuant à la production de vésicules dans les écosystèmes (Gamalier *et al.*, 2017). Par exemple, près de 92 % des bactéries connues du « groupe des *L. casei* » présentent des séquences phagiques dans leur génome et 71 % d'entre elles sont inductibles par la mitomycine C (Mercanti *et al.*, 2011; Pujato *et al.*, 2019).

### **Stress antibiotiques**

Les antibiotiques peuvent induire la production de vésicules de plusieurs manières, selon leur mode d'action et leurs conséquences sur la physiologie de la bactérie.

Andreoni *et al.* (2019) ont montré chez *Staphylococcus aureus* que selon le mode d'action des antibiotiques, la vésiculation est dépendante ou indépendante de la présence de prophages. Par exemple, les antibiotiques diminuant l'intégrité de la paroi cellulaire (ex. beta-lactames) stimulent la production de MVs par bourgeonnement de manière indépendante des phages. À l'inverse, les antibiotiques déclenchant la réponse SOS, comme la mitomycine et la ciprofloxacine, augmentent la formation de vésicules suite à la lyse cellulaire provoquée par des endolysines (Andreoni *et al.*, 2019). De même, l'activation de la réponse SOS chez *Stenophomonas maltophilia* induit une forte production de vésicules associée à l'entrée en cycle lytique de prophages (Devos *et al.*, 2017). Notons que chez *Pseudomonas aeruginosa* la production de MVs en présence de ciprofloxacine est liée à l'activation du système SOS due aux dommages à l'ADN causés par la production d'espèces réactives de l'oxygène (Maredia *et al.*, 2012).

L'induction de la vésiculogénèse a également été rapportée suite au traitement avec de nombreux autres antibiotiques (ex. gentamicine, polymyxineB). Cependant, les mécanismes mis en jeu ne sont pas encore identifiés (Fulsundar *et al.*, 2014; MacDonald and Kuehn, 2013).

### **Disponibilité des nutriments**

La disponibilité des nutriments peut également affecter la production de MVs. Toutefois, les effets semblent être spécifiques de l'espèce bactérienne considérée. Par exemple, la production de MVs par *Pseudomonas fragi* augmente dans des milieux riches alors qu'elle diminue ou n'est pas affectée chez *Bacillus subtilis* et les bactéries de genre *Lysobacter* (Abe *et al.*, 2021; Yu *et al.*, 2018). De manière intéressante, il a été montré que la croissance de *Haemophilus influenzae* dans un environnement limitant en fer entraîne une augmentation de la production de MVs du fait de l'inhibition de l'expression de l'ABC transporteur VacJ/YrbB (Fig. 33) (Roier *et al.*, 2016a). De même, une libération importante de MVs par *Mycobacterium tuberculosis* a été mesurée en condition limitante en fer (R. Prados-Rosales *et al.*, 2014).

### **Oxygène et espèces réactives de l'oxygène**

En condition anoxique, il a été montré que l'augmentation de la lyse cellulaire par *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis* s'accompagne d'une augmentation significative de la quantité de vésicules libérées (Abe *et al.*, 2021; Sabra *et al.*, 2003; Toyofuku *et al.*, 2014, p. 1).

Le traitement de *Pseudomonas aeruginosa* par des espèces réactives de l'oxygène telles que du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a également été associé à une augmentation de la quantité de vésicules libérées par les bactéries. Toutefois, les mécanismes mis en jeu dans cette augmentation n'ont pas encore été caractérisés (MacDonald and Kuehn, 2013).

## Température

Enfin, la température est également un facteur important de la régulation de la biogenèse des vésicules. Néanmoins, les régulations semblent être dépendantes des espèces bactériennes étudiées. En effet, la régulation de la vésiculogénèse par la température a été observée aussi bien chez des bactéries mésophiles comme *Serratia marcescens*, que chez des bactéries psychrophiles présentes dans les eaux froides de l'antarctique (Frias *et al.*, 2010). Notamment, chez *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* et la bactérie psychrophile *Shewanella livingstonensis*, l'augmentation de la température s'accompagne d'une augmentation significative de la vésiculogénèse (Katsui *et al.*, 1982; McMahon *et al.*, 2012). À l'inverse, une augmentation de température de 24 à 39 °C n'entraîne aucune différence significative sur la quantité de vésicules produite par *Pseudomonas aeruginosa* (MacDonald and Kuehn, 2013).

### 3. Rôles attribués aux MVs libérées par les bactéries

Les rôles exercés par les MVs de bactéries sont intimement liés à leurs structures et à leurs compositions. Cette composition est variable selon les mécanismes de biogenèse, les conditions de croissance, les bactéries productrices et leurs états physiologiques (Kulp *et al.*, 2015; Bager *et al.*, 2013). Ainsi, il existe une grande diversité de fonctions exercées par les vésicules issues de bactéries à Gram négatif et à Gram positif.

Dans cette partie, nous allons aborder quelques fonctions jouées par les vésicules de bactéries. L'objectif est d'appréhender la diversité de fonctions existantes, sans ambition d'exhaustivité.

#### 3.1 Système de sécrétion et protection du contenu vésiculaire

Les MVs constituent selon plusieurs auteurs, un système de sécrétion qui permet la protection et le transport des composés qu'elles contiennent (Gill *et al.*, 2019; Guerrero-Mandujano *et al.*, 2017).

En effet, la présence de nombreuses protéines dépourvues de peptide signal dans les surnageants de culture a longtemps été inexplicable et leur sécrétion par les vésicules membranaires offre une explication séduisante (Rieu *et al.*, 2014; Tjalsma *et al.*, 2004). Par ailleurs, les vésicules peuvent également contenir des acides nucléiques (ADN et ARN), des métabolites ainsi que divers composés lipidiques. Les membranes des vésicules offrent ainsi une protection contre les dégradations enzymatiques et une relative protection contre les dégradations physico-chimiques de l'environnement (Alves *et al.*, 2016; Cvjetkovic *et al.*, 2016; Grande *et al.*, 2015; Kulp and Kuehn, 2010).

La notion de système de sécrétion implique la possibilité d'une sélection préférentielle du cargo transporté et d'éventuels destinataires. Les MVs formées par de nombreuses bactéries et notamment les bactéries pathogènes respectent effectivement ces deux conditions. Par exemple, les OMVs libérées par *Helicobacter pylori* sont enrichies en protéines bénéfiques pour l'infection (ex. HtrA) (Hoy *et al.*, 2012; Olofsson *et al.*, 2010). À l'inverse les protéines utilisées par l'hôte pour monter une réponse immunitaire efficace sont exclues des OMVs produites par *Helicobacter pylori* (ex. SabA, BabA) (Bonnington and Kuehn, 2014). De même, chez *Myxococcus xanthus*, il a été observé que la présence de l'activité alcaline phosphatase participant aux comportements de préadaptation des bactéries est quasi exclusivement associée aux OMVs (Evans *et al.*, 2012).

### 3.2 Résistance aux stress environnementaux

Sauf exception, la présence de vésicules permet d'augmenter la résistance des bactéries à une multitude de stress (pH, température, carence nutritionnelle, antibiotiques, phages, ROS, agents génotoxiques) (McMillan and Kuehn, 2021; Orench-Rivera and Kuehn, 2016). La relation qui existe chez de nombreuses bactéries entre réponse aux stress et production de vésicules nourrit l'idée que la sécrétion de vésicules puisse être un mécanisme à part entière de défense aux stress environnementaux. Notamment, l'induction de la vésiculogénèse suite à l'activation de la réponse SOS renforce cette hypothèse (Maredia *et al.*, 2012).

#### Résistance aux antibiotiques

Les vésicules peuvent transporter des enzymes de résistance aux antibiotiques et ainsi conférer une résistance aux bactéries productrices. L'effet protecteur des vésicules bénéficie également aux bactéries environnantes.

Par exemple, la présence de bêta-lactamines dans les OMVs est impliquée dans la résistance de bactéries telles que *Pseudomonas aeruginosa* (Ciofu *et al.*, 2000), *Staphylococcus aureus* (J. Lee *et al.*, 2013) ou encore *Moraxella catarrhalis* (Schaar *et al.*, 2011). De plus, il a été montré que l'augmentation de la production de vésicules par *Escherichia coli* s'accompagne d'une plus grande résistance à divers peptides antimicrobiens (polymyxin B, colistin) (Manning and Kuehn, 2011).

#### Résistance aux limitations nutritionnelles

Le fer est un microélément essentiel très souvent limitant dans les écosystèmes. C'est pourquoi au cours de l'évolution plusieurs mécanismes ont été développés par les bactéries afin de capturer le fer. Ces mécanismes reposent notamment sur la chélation de l'ion par des sidérophores ou par des protéines à hème. Il a été montré que *Mycobacterium tuberculosis* augmente la production de MVs enrichies en sidérophores appelés mycobactines en réponse à une restriction en fer. La mycobactine présente dans les vésicules participe ainsi à la concentration du fer de l'environnement (R. Prados-Rosales *et al.*, 2014). Les mécanismes mis en jeu par les mycobactéries dans la récupération des vésicules enrichies en fer par les mycobactéries ne sont toutefois pas encore élucidés. De même, de nombreux transporteurs de sidérophores ont été identifiés parmi les 50 protéines les plus fréquemment retrouvées dans les OMVs de bactéries à Gram négatif (J. Lee *et al.*, 2016). Par exemple, les OMVs de *Neisseria meningitidis* et de *Porphyromonas gingivalis* contiennent les protéines Fet-A et Fet-B qui sont capables de chélater le fer (Lappann *et al.*, 2013; Veith *et al.*, 2014). Notons que les OMVs de *Neisseria meningitidis* contiennent également des protéines chélatrices de zinc (ZnuA et ZnuD) suggérant ainsi qu'en plus des ions fer, d'autres ions peuvent être enrichis dans les vésicules (Lappann *et al.*, 2013).

#### Détoxification

Les vésicules contribuent à la détoxification des bactéries à Gram négatif.

Par exemple, les bactéries *Pseudomonas putida* sont capables d'éliminer le toluène - un solvant organique toxique qui adhère aux membranes externes - en produisant des OMVs. En effet, en s'insérant dans la membrane externe, le toluène entraîne un changement de courbure de la membrane favorisant ainsi la formation de vésicules par bourgeonnement (Kobayashi *et al.*, 2000).

De plus, il a été montré que la production de vésicules constitue un mécanisme permettant de débarrasser la membrane externe de LPS dégradés et d'autres éléments affectant la survie de la bactérie (Bonnington and Kuehn, 2016; Zingl *et al.*, 2020). Enfin, comme expliqué précédemment, les

OMVs permettent d'éliminer du périplasme des accumulations toxiques de protéines mal conformées et divers agrégats (McBroom and Kuehn, 2007; Schwechheimer and Kuehn, 2015).

### **Résistance aux phages**

Les MVs peuvent protéger les bactéries contre les infections par certains bactériophages lorsque les protéines d'absorption du phage sont présentes à leur surface. De cette manière, les vésicules constituent des leurres dans lesquels les phages transfèrent leur matériel génétique. Par exemple, les phages T4 interagissent rapidement et de manière irréversible avec les OMVs d'*Escherichia coli* protégeant ainsi les populations de bactéries sensibles (Manning and Kuehn, 2011).

Bien que les vésicules constituent une contrainte majeure à court terme pour les phages, elles constituent aussi du point de vue évolutif une opportunité d'élargir leur spectre d'ineffectivité. En effet, une fois le matériel génétique présent dans les vésicules, l'ADN phagique peut fusionner avec un large spectre de bactéries. De plus, les vésicules produites par des souches sensibles peuvent transférer des protéines d'adsorption à des souches résistantes, les rendant ainsi potentiellement susceptibles à de nouveaux phages (Tzipilevich *et al.*, 2017).

Il est intéressant de noter que l'interaction de phages avec des vésicules a été observée dans les écosystèmes marins, suggérant ainsi l'importance de cette stratégie comme ligne de défense contre les phages dans l'environnement (Biller *et al.*, 2014a).

### **3.3 Contribution des MVs au sein des communautés microbiennes**

Des MVs bactériennes ont pu être identifiées dans tous les écosystèmes étudiés à ce jour (Biller *et al.*, 2014a; Frias *et al.*, 2010; Yun *et al.*, 2017). Les MVs sont libérées dans les milieux liquides et solides de laboratoire, dans l'environnement (Beveridge *et al.*, 1997) ainsi que dans les cellules et tissus de l'hôte (Hickey *et al.*, 2015; Prados-Rosales *et al.*, 2011). De plus, les MVs sont produites aussi bien par des bactéries au sein des biofilms que par des bactéries planctoniques (Beveridge *et al.*, 1997). L'ubiquité des MVs bactériennes dans l'environnement est un argument fort suggérant que ces nanostructures jouent un rôle important dans les interactions entre microorganismes.

#### **3.3.1 Contribution des MVs aux interactions bactéries/bactéries**

##### **Communication cellulaire**

Les vésicules peuvent transporter des molécules de quorum sensing, contribuant ainsi aux mécanismes de communication entre microorganismes (Li *et al.*, 2016; Toyofuku *et al.*, 2017b). Notamment, chez *Paracoccus denitrificans*, il a été montré que des N-acyl homoserine lactones (AHLs) sont présentes en quantité suffisante dans les vésicules pour induire une réponse sur les bactéries avoisinantes (Toyofuku *et al.*, 2017b). Cette communication médiée par les vésicules génère aussi de l'hétérogénéité dans la réponse des populations bactériennes. En effet, l'intensité de la réponse déclenchée par les cellules avoisinantes dépend du nombre de vésicules reçues par les bactéries. Or, ce nombre varie selon la distance, la densité cellulaire et la quantité de vésicules libérées (Toyofuku *et al.*, 2017b). Cette particularité génère une hétérogénéité des populations bactériennes, les rendant potentiellement plus susceptibles de résister aux changements environnementaux.

##### **Compétition et collaboration métabolique**

Les OMVs libérées par *Pseudomonas aeruginosa* contiennent des protéines (ex. hydrolase du peptidoglycane) capables de lyser un large spectre de bactéries compétitrices (Gram négatif et Gram positif) (Beveridge *et al.*, 1997; Kadurugamuwa and Beveridge, 1996). De manière intéressante, les

vésicules n'ont aucun effet sur les bactéries de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*. Ainsi, Kadurugamuwa et Beveridge (1996) proposent que la lyse induite par les vésicules permet d'éliminer les espèces concurrentes et de libérer des nutriments, qui sont ensuite utilisés par les bactéries environnantes.

À l'inverse, les OMVs des cyanobactéries du genre *Prochlorococcus* ont été décrites comme une source de carbone, d'azote et de phosphore utilisée pour la croissance des microorganismes hétérotrophes du genre *Alteromonas* et *Halomonas* (Biller *et al.*, 2014).

De même, les bactéries du genre *Bacteroidales* secrètent des glycosides hydrolases et des polysaccharides lyases par l'intermédiaire des OMVs, dont l'activité bénéficie à la flore microbienne du tractus gastro-intestinal (Rakoff-Nahoum *et al.*, 2014).

### **Comportement de prédation**

*Myxococcus xanthus* est une bactérie connue pour ces comportements de prédation envers des microorganismes du sol. Cette bactérie produit de grandes quantités de vésicules dans lesquelles ont été identifiés divers enzymes hydrolytiques ainsi que divers métabolites aux propriétés antibiotiques (Berleman *et al.*, 2014). Il a notamment été montré que les OMVs de *Myxococcus xanthus* sont capables de lyser des bactéries de l'espèce *Escherichia coli* (Evans *et al.*, 2012).

De même, la bactérie *Lysobacter sp.* XL1 secrète des enzymes bactériolytiques dans le milieu environnant par l'intermédiaire d'OMVs à des fins de prédation. Parmi les enzymes bactériolytiques, l'endopeptidase L5 est secrétée dans l'environnement exclusivement par l'intermédiaire des OMVs (Vasilyeva *et al.*, 2008).

### **Transferts horizontaux de gènes (THG)**

La présence de matériel génétique a initialement été détectée dans des MVs issues de diverses bactéries à Gram négatif (Dorward and Garon, 1990b). Leur contribution aux THG a été démontrée 10 ans plus tard dans une publication mettant en évidence le rôle des OMVs de *Escherichia coli* dans l'acquisition de gènes de résistance et de gènes de virulence par plusieurs entérobactéries (Yaron *et al.*, 2000).

De manière intéressante, il a été montré chez *Pseudomonas aeruginosa* que l'ADN est majoritairement associé à la surface des MVs. De l'ADN est également présent dans la lumière des MVs, mais il est présent en quantité plus faible (Bitto *et al.*, 2017).

Chez la bactérie à Gram négatif *Shewanella vesiculosa* M7T, la majorité de l'ADN présent dans les vésicules est contenu dans les IOMVs (Pérez-Cruz *et al.*, 2013). La présence d'ADN dans les OIMVs a également été identifiée chez d'autres bactéries à Gram négatif comme *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 et *Acinetobacter baumannii* AB41 (Pérez-Cruz *et al.*, 2015).

## **3.3.2 Contribution des MVs aux interactions bactéries/hôtes**

### **Mécanismes d'interaction et d'internalisation**

Les MVs bactériennes sont capables de traverser les barrières épithéliales de l'hôte (Hickey *et al.*, 2015; O'Donoghue and Krachler, 2016a). Par ailleurs, la présence de certaines protéines transmembranaires leur confère la capacité d'interagir spécifiquement avec des cellules cibles et de délivrer leur contenu (Bonnington and Kuehn, 2014). Par exemple, il a été montré dans un modèle

souris que les OMVs de *Bacteroides thetaiotaomicron* sont capables de traverser la barrière épithéliale de l'intestin et d'interagir avec les macrophages résidants dans la *lamina propria* (Hickey *et al.*, 2015).

L'internalisation des MVs dans les cellules de l'hôte met en jeu divers processus parmi lesquels la fusion membranaire, la phagocytose, la macropinocytose, l'endocytose clathrine dépendante, l'endocytose caveoline dépendante ou encore l'endocytose clathrine-cavelonie indépendante (O'Donoghue and Krachler, 2016a; Turner *et al.*, 2018). Notamment, les OMVs de *Borrelia burgdorferi* sont capables de fusionner avec la membrane de l'hôte et ainsi de leur transférer l'ensemble du contenu vésiculaire (Crowley *et al.*, 2013).

### **Effet immunomodulateur des MVs de bactéries commensales**

Il a été montré que la bactérie commensale *Bacteroides fragilis* réduit l'inflammation du côlon chez la souris grâce à la sécrétion de polysaccharide A (PSA) par l'intermédiaire des OMVs (Shen *et al.*, 2012; Ochoa-Repáraz *et al.*, 2010). De plus, les PSA empêchent également le déclenchement de réponses immunitaires dirigées contre *Bacteroides fragilis* dans les conditions normales de colonisation (Round *et al.*, 2011).

### **Implication des MVs dans la pathogenèse**

De nombreux exemples dans la littérature montrent que les vésicules de pathogènes sont impliquées dans les processus infectieux.

Par exemple, chez *Helicobacter pylori* la sécrétion du facteur de virulence VacA par les OMVs est impliquée dans la disruption de la chromatine (Chitcholtan *et al.*, 2008).

Il a également été montré que les OMVs de *Moraxella catarrhalis* sont capables de neutraliser les défenses immunitaires de l'hôte grâce à la présence d'inhibiteurs du complément appelés UspA1/A2. Présentes à la surface des OMVs, les protéines UspA1/A2 empêchent le déclenchement de la cascade d'activation du complément en interagissant avec la sous unité C3 du complément. Notons que l'inhibition du complément favorise non seulement la survie de *Moraxella Catarrhalis* mais également la survie de *Haemophilus influenzae*, une bactérie fréquemment associée aux infections à *Moraxella catarrhalis* (Tan *et al.*, 2007).

Par ailleurs, les OMVs de *Moraxella Catarrhalis* sont également capables de leurrer le système immunitaire en déclenchant une réponse immunitaire non adaptée. En effet, les OMVs contiennent des super antigènes appelés MID qui sont capables d'activer les lymphocytes de manière aspécifique, retardant ainsi les réponses immunitaires dirigées contre la bactérie (Perez Vidakovics *et al.*, 2010).

## **4. Relation entre les MVs et la forme de vie biofilm**

### **4.1 Présence de MVs dans les biofilms**

Les biofilms sont le mode de vie prédominant des bactéries dans l'environnement. Ils sont présents dans une grande diversité d'habitats et on estime que près de 40 à 80 % des microorganismes sur terre résident dans un biofilm (Flemming and Wuertz, 2019). La présence et la contribution des vésicules au mode de vie biofilm, fait l'objet d'un fort intérêt depuis les 10 dernières années. En effet, leur présence dans la matrice de nombreux biofilms de l'environnement suggère qu'elles sont un constituant répandu, jouant des rôles spécifiques dans les biofilms (Schooling and Beveridge, 2006). Les vésicules ont été identifiées dans de nombreux biofilms de bactéries à Gram négatifs et représentent selon les espèces une proportion plus ou moins importante de la matrice. Par exemple, dans les biofilms formés



par *Pseudomonas aeruginosa*, les OMVs contribuent à près de 52 % du LPS présent dans la matrice (Schooling and Beveridge, 2006) et environ 30 % du protéome (Toyofuku *et al.*, 2012). Des OMVs ont également été observées dans les biofilms de nombreuses autres bactéries à Gram négatif telles que *Francisella* spp. (van Hoek, 2013), *Myxococcus xanthus* (Palsdottir *et al.*, 2009) ou encore *Helicobacter pylori* (Yonezawa *et al.*, 2009).

De même, la présence de MVs a également été visualisée dans des biofilms de nombreuses bactéries à Gram positif comme *Bacillus subtilis* (Brown *et al.*, 2014), *Staphylococcus epidermidis* (Takahashi *et al.*, 2021) ou *Lactobacillus reuteri* (Grande *et al.*, 2017, p. 17938).

#### 4.2. Caractéristiques des MVs de biofilms

Les MVs libérées par les biofilms de certaines espèces bactériennes présentent des caractéristiques de taille et de composition différentes de celles isolées de bactéries planctoniques. Par exemple, le diamètre moyen des MVs isolées de cultures planctoniques de *Pseudomonas aeruginosa* est de 45 nm, alors que les vésicules de biofilms ont une taille de 86 nm diamètre (Schooling and Beveridge, 2006). De même, l'analyse de la composition protéique de ces vésicules a montré des différences remarquables. En particulier, plusieurs facteurs de virulence présents dans les vésicules libérées par les bactéries planctoniques sont absents des vésicules de biofilms malgré leur présence dans la matrice extracellulaire. Ces résultats suggèrent ainsi que ces facteurs de virulence sont exclus spécifiquement des vésicules lorsque les bactéries se trouvent au sein d'un biofilm (Toyofuku *et al.*, 2012). À l'inverse, les vésicules libérées par *Bacillus subtilis* en culture planctonique et en biofilm présentent des tailles similaires malgré des conditions de croissance différentes (Brown *et al.*, 2014).

Ces résultats d'apparence contradictoires indiquent que les caractéristiques des vésicules libérées par les bactéries varient selon les espèces et les conditions de croissances. Cette variabilité rend ainsi difficile la généralisation de phénomènes observés chez une espèce donnée et plaide pour la diversification des modèles bactériens étudiés.

#### 4.3 MVs et matrice extracellulaire

##### 4.3.1 Les MVs sont un élément structurant de la matrice extracellulaire

Les vésicules de certaines bactéries contribuent à la structure de la matrice extracellulaire et favorisent la formation des biofilms selon différents mécanismes.

La présence d'adhésine dans les vésicules de certaines bactéries participe à l'attachement, à l'agrégation et à la structuration des biofilms. Par exemple, il a été montré que les adhésines présentes dans les OMVs de *Porphyromonas gingivalis* entraînent l'agrégation de nombreuses bactéries (Kamaguchi *et al.*, 2003a, 2003b). Notamment, les gingipaines présentes dans les OMVs à la surface de *Porphyromonas gingivalis* favorisent la formation de biofilms mixtes avec *Treponema denticola* (Ito *et al.*, 2010). De même, les vésicules libérées par la bactérie à Gram positif *Streptococcus mutans* contiennent des glucosyltransferases qui favorisent la formation de biofilms de *Streptococcus* spp., *Actinomyces naeslundii*, et *Fusobacterium nucleatum* (Iwabuchi *et al.*, 2021; Senpuku *et al.*, 2019).

L'augmentation de l'hydrophobicité des cellules en raison de la présence des vésicules à la surface des bactéries est un autre mécanisme favorisant la formation des biofilms. Ce mécanisme a notamment été décrit chez des bactéries à Gram négatif comme *Pseudomonas putida* (Baumgarten *et al.*, 2012) et

chez des bactéries à Gram positif comme *Staphylococcus aureus* (He *et al.*, 2019). Dans le travail de He *et al.* (2019), les auteurs montrent que la formation des biofilms suite au traitement par des bêta-lactamines est principalement le résultat de l'augmentation de l'hydrophobicité des surfaces cellulaires liée aux MVs. De plus, ils soulignent que dans les conditions de l'expérience, les adhésines, les protéines de la paroi cellulaire et l'ADN extracellulaire contribuent faiblement à la formation du biofilm en comparaison au rôle joué par le changement d'hydrophobicité (He *et al.*, 2019).

Par ailleurs, il existe de nombreux exemples dans la littérature montrant une forte corrélation entre augmentation de la production de vésicules et formation de biofilms. On peut notamment citer le cas des biofilms de *Vibrio fischeri* (Shibata and Visick, 2012) et de *Helicobacter pylori* (Yonezawa *et al.*, 2009). Toutefois, la contribution des vésicules dans la formation de ces biofilms reste à élucider.

#### 4.3.2 Libération d'ADN extracellulaire

L'ADN extracellulaire (ADNe) est l'un des composants majeurs de la matrice des biofilms bactériens. Il joue de nombreuses fonctions et est notamment impliqué dans la structuration et la stabilisation du biofilm au cours de la maturation (Schooling *et al.*, 2009; Whitchurch *et al.*, 2002). Il favorise notamment l'agrégation des bactéries entre elles et contribue à l'adhésion des biofilms aux surfaces biotiques et abiotiques (Mlynek *et al.*, 2020). De plus, les ADNe participent également à la tolérance des bactéries aux stress antibiotiques en neutralisant les antibiotiques cationiques et en acidifiant localement le biofilm (Mulcahy *et al.*, 2008; Wilton *et al.*, 2016). Par ailleurs, les ADNe sont l'un des mécanismes majeurs des transferts horizontaux de gènes, contribuant ainsi à l'acquisition de gènes de résistances aux antibiotiques. Enfin, ils représentent également une source de nutriments en condition limitante (Finkel and Kolter, 2001).

De manière remarquable, de nombreux mécanismes impliqués dans l'accumulation d'ADNe dans les biofilms sont également impliqués dans la libération de MVs (Campoccia *et al.*, 2021). Notamment, la dégradation de la paroi par des hydrolases du peptidoglycane (ex. autolysines, endolysines), la lyse cellulaire et la prédation par des phages sont des mécanismes partagés (Turnbull *et al.*, 2016a). De plus, il a été montré que les MVs sont une voie importante de la libération d'ADNe dans la matrice. Cette libération médiée par les vésicules permet notamment de protéger l'ADN des dégradations enzymatiques (Kahn *et al.*, 1983; Renelli *et al.*, 2004).

Chez *Pseudomonas aeruginosa* la production de vésicules contenant de l'ADNe et la libération d'ADNe suite à la lyse cellulaire sont deux mécanismes majeurs de la formation du biofilm bactérien (Turnbull *et al.*, 2016a). Les OMVs de *Pseudomonas aeruginosa* contiennent de l'ADNe à l'intérieur et à la surface des MVs. Elles jouent ainsi un rôle important dans la structuration de la matrice en permettant des interactions avec les autres composants de la matrice extracellulaire du biofilm (Schooling *et al.*, 2009). Enfin, de l'ADNe a également été identifié dans les OMVs d'autres bactéries à Gram négatif, appuyant ainsi l'idée d'un rôle structurel de l'association vésicule-ADNe dans les biofilms (Pérez-Cruz *et al.*, 2015; Pierson *et al.*, 2011; Sahu *et al.*, 2012).

De même, la libération d'ADNe par les MVs et leurs contributions dans l'intégrité structurelle et la stabilité du biofilm a été montré chez des bactéries à Gram positif telles que *Streptococcus mutans* (Liao *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2020) et *Staphylococcus aureus* (Andreoni *et al.*, 2019).

#### 4.4 Rôles des MVs dans les biofilms

Les vésicules peuvent jouer un ensemble de fonctions dans les biofilms comme expliqué dans la partie 3 de ce chapitre. Il faut toutefois souligner que dans les biofilms, l'impact des vésicules est accentué par leur proximité avec les microorganismes et leur concentration dans la matrice du biofilm. Ainsi, cela suggère que d'un point de vue physiologique, les biofilms sont potentiellement l'écosystème dans lequel les vésicules influencent le plus fortement la fitness des bactéries. C'est pourquoi le rôle des MVs dans la formation, la communication, l'acquisition de nutriments et la défense des bactéries est une question particulièrement importante au sein des biofilms qui est encore peu abordée dans la littérature. De plus, des rôles spécifiques joués par les vésicules de biofilms ont pu être identifiés pour certaines bactéries à Gram négatif.

Par exemple, les OMVs libérées par *Pseudomonas aeruginosa* dans les biofilms sont capables de lyser les bactéries voisines entraînant ainsi la libération de nutriments et d'ADNe impliqués dans la structuration du biofilm (Beveridge *et al.*, 1997). De même, il a été observé chez *Pseudomonas aeruginosa* que les vésicules libérées au cours de la maturation des biofilms sont enrichies en protéines neutralisantes impliquées dans la tolérance aux stress antibiotiques (Park *et al.*, 2014).

Les OMVs de *Myxococcus xanthus* sont organisées en chainettes dans le biofilm et forment un véritable réseau qui permet de connecter les cellules les unes aux autres. De manière intéressante, il a été observé que la production de vésicules et de nanotubes issus des membranes externes est fortement augmentée lorsque les bactéries se trouvent au sein des biofilms. Les auteurs de ces travaux suggèrent que ces réseaux membranaires assurent un rôle d'échange et de coordination cellulaire au sein du biofilm (Remis *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2014).

#### 4.5 Inhibition des biofilms

Comme nous avons pu le voir, les vésicules bactériennes jouent de nombreux rôles favorisant la formation des biofilms. Toutefois, il a également été observé que les MVs de certaines espèces bactériennes empêchent la formation des biofilms et facilitent la dispersion cellulaire. Ces effets inhibiteurs ont été moins décrits dans la littérature, mais il est cependant très probable qu'ils jouent un rôle important dans les interactions entre microorganismes dans l'environnement. En effet, la libération de vésicules aux activités antimicrobiennes pourrait être utilisée par les bactéries pour moduler la composition et la formation des biofilms. De plus, des variations de la quantité de vésicules sécrétées et de leur contenu en réponse à l'environnement pourraient également participer à la modulation des biofilms.

Par exemple, il a été montré qu'une aminopeptidase associée aux vésicules de *Pseudomonas aeruginosa* entraîne le détachement du biofilm mature établi sur des cellules épithéliales pulmonaires. De cette manière, les vésicules contribuent à la dissémination de l'infection lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables (Esoda and Kuehn, 2019). De même, en présence de pression antibiotique, les MVs libérées par *Staphylococcus epidermidis* diminuent la fixation des cellules à des surfaces de verre et de polystyrène (Zaborowska *et al.*, 2020).

Par ailleurs, les OMVs peuvent également avoir des effets inhibiteurs sur des bactéries compétitrices. Il a été montré que les OMVs de *Burkholderia thailandensis* contiennent divers composés bactéricides (ex. surfactant, hydrolases du peptidoglycane, quinoléines) permettant de réduire la biomasse et

l'intégrité des biofilms formés par *Streptococcus mutans* (Wang *et al.*, 2021). De manière similaire, l'activité antimicrobienne des MVs de *L. plantarum* permet de prévenir la formation des biofilms de *Shewanella putrefaciens* sur des surfaces alimentaires (Lee *et al.*, 2021).



### Chapitre 3 : Les vésicules membranaires de lactobacilles

Le premier article mentionnant la production de vésicules par un lactobacille remonte aux années 90 (Pollacka, 1992a), cependant l'intérêt suscité par ces vésicules est quant à lui très récent. En effet, on peut constater une forte augmentation du nombre de publications sur les vésicules de lactobacilles depuis 2017 (Fig. 34). La caractérisation physico-chimique des vésicules de nombreux lactobacilles a notamment été publiée au cours des 5 dernières années. De plus, les fonctions exercées par ces vésicules font également l'objet de nombreuses publications depuis 2020. En particulier, l'étude des activités probiotiques exercées par les MVs suscitent un fort intérêt. Notamment, l'effet immunomodulateur exercé sur les cellules de l'hôte est le thème le plus largement abordé.

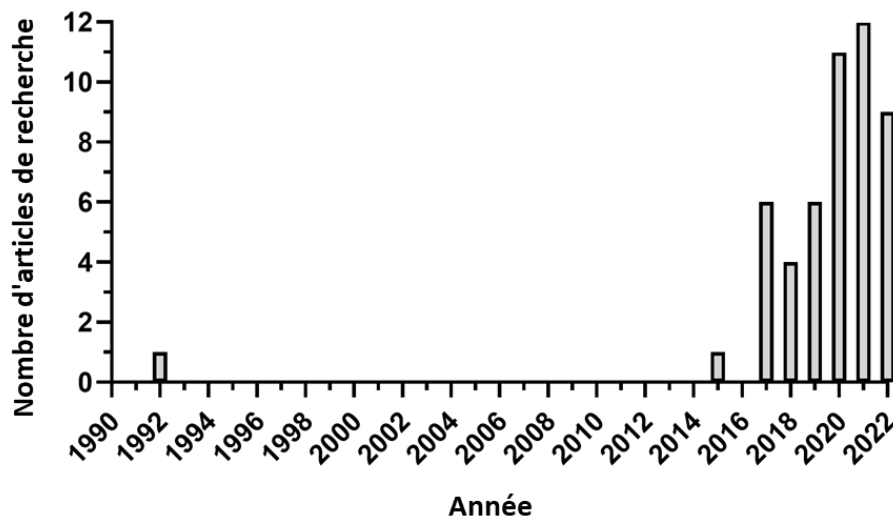


Fig. 34 Evolution du nombre d'articles de recherche publiés sur les vésicules membranaires de lactobacilles.

Cette partie a pour objectif de présenter l'état des connaissances acquises au cours des 30 dernières années sur les MVs de lactobacilles.

#### 1. Biogenèse et caractérisation des MVs de lactobacilles

##### Caractérisation des vésicules de lactobacilles

La majorité des publications sur les vésicules de lactobacilles présente des éléments de caractérisation. Notamment, la taille des vésicules est mesurée dans plus de 60% des études publiées à ce jour et le NTA est la méthode la plus utilisée, à la fois pour estimer la taille et la concentration des vésicules. L'ensemble de ces travaux montre que les vésicules de lactobacilles ont une taille équivalente à celles des autres de bactéries à Gram positif : entre 20 et 400 nanomètres de diamètre.

Les MVs de lactobacilles contiennent des lipides et de nombreuses protéines cellulaires. Selon les espèces, les vésicules peuvent également contenir des fragments d'ADN génomique (Grande *et al.*, 2017; Puca *et al.*, 2019), des ARN (Domínguez Rubio *et al.*, 2017; Mata Forsberg *et al.*, 2019), du peptidoglycane (Morishita *et al.*, 2022) ou encore des acides lipoteichoïques (Pollacka, 1992a; Shiraishi *et al.*, 2018; Champagne-Jorgensen *et al.*, 2021b). La composition est variable selon les espèces et explique la diversité des activités que les vésicules exercent sur les cellules de l'hôte.

## Biogenèse et régulation

Bien que peu d'information soit disponible sur la biogenèse des MVs de lactobacilles, il est fort probable que les mécanismes identifiés chez les autres bactéries à Gram positif soient partagés par les lactobacilles (Fig. 24).

En particulier, la réduction de l'intégrité de la paroi bactérienne est un mécanisme clé de la production de vésicules des bactéries à Gram positif, qui a également été identifié chez certains lactobacilles. En effet, il a été montré que le traitement par des antibiotiques ciblant la synthèse du peptidoglycane conduit à une forte libération de vésicules par *L. casei* (Pollacka, 1992a). Les auteurs précisent par ailleurs que la formation de ces vésicules n'est pas le résultat d'une bactériolyse, étant donné que les vésicules sont libérées par des bactéries ayant conservé leur morphologie. Ces observations sont similaires à celles réalisées sur *Bacillus subtilis* qui maintient sa morphologie malgré les dégradations de la paroi par des endolysines (Toyofuku *et al.*, 2017a).

De plus, il a également été observé que le traitement de *L. paracasei* par des sels biliaires entraîne une augmentation de la production de MVs. Les auteurs suggèrent que la modification des charges membranaires et l'altération de la paroi par les sels biliaires favorisent le bourgeonnement et la production de vésicules (Ma *et al.*, 2018).

De manière intéressante, Müller *et al.* (2021) ont montré que la présence de stress influence la production de vésicules de manière variable selon les espèces de lactobacilles. En effet, la culture de *L. casei* dans un milieu à pH 8 entraîne une forte augmentation de la production de vésicules en comparaison à un milieu à pH 5. À l'inverse, l'impact du pH sur la production de vésicules par *L. plantarum* est quant à lui plus modeste (Müller *et al.*, 2021). Cette variabilité rend ainsi difficile la généralisation de résultats observés sur une souche donnée à l'ensemble des lactobacilles.

L'analyse de la composition des vésicules de lactobacilles a permis de mettre en évidence l'accumulation et l'exclusion de certaines protéines et de certains lipides. Ces observations suggèrent que plusieurs mécanismes pourraient être impliqués dans la production des vésicules (Dean *et al.*, 2019; Harrison *et al.*, 2021; H. Kim *et al.*, 2020). Par exemple, il est possible que les vésicules se forment préférentiellement au niveau de domaines lipidiques de la membrane cytoplasmique. De plus, il est également possible que certaines molécules soient exclues ou préférentiellement empaquetées dans les vésicules de manière active ou passive. Enfin, ces différences pourraient être le résultat de la production de vésicules par des sous-populations bactériennes présentes dans un état physiologique particulier.

## 2. MVs de lactobacilles et mode de vie biofilm

L'influence des vésicules de lactobacilles sur les biofilms est une thématique sur laquelle il existe peu d'éléments. La majorité des travaux ont été menés sur *L. reuteri* et le rôle joué par les vésicules dans les biofilms reste encore à élucider. Notamment, il a été montré que des MVs sont présentes dans la matrice extracellulaire et dans le milieu de culture des biofilms de *L. reuteri* (Grande *et al.*, 2017, p. 17938; Maccelli *et al.*, 2020; Puca *et al.*, 2019). Par ailleurs, il semblerait que les bactéries produisent davantage de MVs lorsqu'elles sont au sein des biofilms (Puca *et al.*, 2019). De plus, tout comme les vésicules libérées par les bactéries planctoniques, il apparaît que les vésicules de biofilms contiennent de l'ADN qui est présent à la fois dans la lumière et à la surface des vésicules (Grande *et al.*, 2017). La présence d'ADN dans les vésicules suggère ainsi un rôle dans la formation et le maintien de la structure des biofilms (Mlynek *et al.*, 2020). Toutefois, sa contribution dans la formation des biofilms n'a pas encore été démontré.

A l'inverse, il a été montré que les vésicules de *L. plantarum* préviennent la formation des biofilms formés par les bactéries d'altération *Shewanella putrefaciens* (Lee *et al.*, 2021). Cette inhibition est due à l'activité bactéricide de composés transportés par les vésicules. La nature de ces composés n'a pas encore été identifiée.

### 3. Effets probiotiques des MVs de lactobacilles

Le rôle probiotique des vésicules de lactobacilles fait l'objet de nombreuses publications. En particulier, les rôles antimicrobiens et immunomodulateurs sont les thèmes majoritairement étudiés par la communauté scientifique. Cet intérêt s'explique notamment par le fait que l'utilisation thérapeutique ou antimicrobienne des vésicules présente de nombreux avantages en comparaison à l'utilisation de bactéries entières. En effet, les vésicules offrent théoriquement la possibilité de bénéficier d'activités probiotiques sans les risques associés à l'utilisation de bactéries vivantes (Aguirre and Collins, 1993; Cannon *et al.*, 2005; Salminen *et al.*, 2006; Fradiani *et al.*, 2010; Tena *et al.*, 2013; Vahabnezhad *et al.*, 2013; Callaway *et al.*, 2013). Par exemples, les vésicules pourraient être utilisées chez des patients immunodéprimés ou pour traiter des pathologies associées à la rupture de l'intégrité de l'épithélium intestinal. De plus, le statut GRAS des probiotiques facilite l'utilisation thérapeutique ou industrielle des vésicules (Carvalho *et al.*, 2021; Giordani *et al.*, 2021).

Les rôles probiotiques des vésicules sont directement liés à leur composition moléculaire. Comme expliqué précédemment, cette composition varie fortement d'une espèce à l'autre et dépend de l'état physiologique des bactéries (Kulp *et al.*, 2015; Bager *et al.*, 2013). C'est pourquoi, les effets antimicrobiens ou immunomodulateurs des vésicules sont variables selon les lactobacilles qui les produisent.

#### 3.1 Activités antimicrobiennes

Certains lactobacilles produisent des vésicules aux activités antimicrobiennes. En effet, il a été montré que les MVs de *L. acidophilus* sont enrichies en peptides antimicrobiens appelés bactériocines qui inhibent la croissance d'autres bactéries et compromettent l'intégrité de leur membrane (Dean *et al.*, 2020). De même, les MVs de *L. plantarum* ont une forte activité bactéricide sur *Shewanella putrefaciens*, permettant ainsi de prévenir leur développement sur des matrices alimentaires (Lee *et al.*, 2021).

A l'inverse, aucune molécule antimicrobienne n'a pu être détectée dans les vésicules de *L. reuteri* contrairement au surnageant de culture qui présente une forte activité antimicrobienne (Maccelli *et al.*, 2020).

#### 3.2 Communication avec l'hôte

##### Présence de MVs libérées par les lactobacilles dans l'organisme de l'hôte

La présence des lactobacilles chez un individu sain est limitée au tractus gastro intestinal ou à la flore vaginale. C'est pourquoi on trouve des lactobacilles et des MVs en grande quantité dans les fèces (Shin *et al.*, 2021).

Toutefois, contrairement aux bactéries, les MVs sont capables de franchir les barrières épithéliales et de migrer sur de longues distances au sein de leur hôte. Par conséquent, des vésicules de nombreuses espèces bactériennes sont détectées dans la circulation sanguine chez les mammifères (Park *et al.*,



2017). Notamment, suite à l'ingestion par voie orale de *L. rhamnosus*, il a été montré que des MVs libérées par la bactérie sont rapidement détectées dans la circulation sanguine (Champagne-Jorgensen *et al.*, 2021a). Cette présence pourrait en partie expliquer les bénéfices apportés par les probiotiques dans les tissus éloignés de l'épithélium du tractus intestinal (Sarkar *et al.*, 2016).

Par ailleurs, cette capacité à traverser les épithéliums implique que les MVs peuvent atteindre la *lamina propria* (Fig. 18) et interagir avec les cellules immunitaires qui s'y trouvent (Hickey *et al.*, 2015). Les vésicules peuvent ainsi jouer un rôle immunomodulateur et participer à la tolérance du microbiote comme expliqué ci-dessous (Partie 3.3).

De manière intéressante, il a été montré que les MVs de *L. plantarum* sont capables de moduler la composition du microbiote intestinal et permettraient ainsi d'atténuer les colites ulcéreuses provoquées par le DSS chez la souris (Hao *et al.*, 2021). Ce travail suggère ainsi que les vésicules peuvent impacter indirectement leur hôte en modulant la composition du microbiote. Dans ce contexte, les vésicules pourraient être l'un des outils qui participe à la communication entre l'hôte, son microbiote et les probiotiques sur la base du modèle présenté figure 16. En outre, la présence systémique de vésicules bactériennes dans l'organisme renforce l'idée d'une communication entre l'hôte et son microbiote.

#### **Entrée des MVs dans les cellules de l'hôte**

Les MVs bactériennes sont capables de pénétrer dans les cellules de l'hôte de plusieurs manières (O'Donoghue and Krachler, 2016b). Des travaux *in vitro* ont permis de mettre en évidence que les vésicules de lactobacilles sont internalisées aussi bien par des cellules épithéliales (Li *et al.*, 2017; Seo *et al.*, 2018; Bajic *et al.*, 2020; Champagne-Jorgensen *et al.*, 2021b), que par des cellules de l'immunité innée (Morishita *et al.*, 2021). Dans la majorité des cas, il apparaît que les vésicules sont internalisées par endocytose « clathrine dépendante ». En effet, il a été montré que le traitement de lignées cellulaires épithéliales (HT29, Caco-2) ou de cellules immunitaires (RAW264.7, DC2.4) par des inhibiteurs de l'endocytose réduit fortement l'internalisation des MVs *in vitro*.

#### **Modulation des cellules de l'hôte**

Les vésicules de *L. plantarum* sont capables de moduler l'expression de certains gènes de l'hôte. Il a été montré que le micro-ARN appelé ARN-71, présent dans les MVs de *L. plantarum* réduit considérablement l'expression du gène *Tp53* des cellules épithéliales HEK 293T (Yu *et al.*, 2022). Cette modulation médiée par les micro-ARN des MVs est un mécanisme probablement sous-estimé dans les régulations de la communication hôte-probiotiques. En effet, la présence d'ARN a été identifiée dans les vésicules de nombreuses autres lactobacilles telles que *L. casei* (Domínguez Rubio *et al.*, 2017), *L. reuteri* (Hu *et al.*, 2021) et *L. rhamnosus* (Mata Forsberg *et al.*, 2019).

### **3.3 Activité des vésicules sur le système immunitaire de l'hôte**

Les MVs de lactobacilles transportent un ensemble de molécules qui peuvent être reconnues par des récepteurs de l'immunité exprimés à la surface des cellules épithéliales et des cellules immunitaires de l'hôte. L'activation de ces récepteurs conduit ainsi à des réponses qui participent à la modulation du système immunitaire. De nombreux articles décrivent les effets immunomodulateurs des vésicules de lactobacilles sur des modèles cellulaires et sur des modèles murins. Toutefois, la quantité de vésicules libérées par des lactobacilles dans le microbiote et leur contribution dans les effets probiotiques restent encore à évaluer.

### **Renforcement de la barrière épithéliale**

Le système immunitaire intestinal doit maintenir l'équilibre permettant la tolérance des bactéries commensales et l'élimination des agents pathogènes. Comme expliqué au chapitre 1, un ensemble de cellules sont impliquées dans la défense de l'organisme au niveau intestinal. Notamment, les cellules épithéliales qui bordent la lumière du TGI forment une barrière immunitaire cruciale dans la protection de l'organisme contre les infections. En plus de ce rôle barrière, les cellules épithéliales sont un relai entre le microbiote et le système immunitaire. Ainsi, le maintien de l'intégrité de l'épithélium est un enjeu majeur pour permettre de défendre l'organisme.

Il a été démontré que les MVs de lactobacilles provenant du kéfir renforcent les jonctions serrées établies entre des cellules épithéliales *in vitro* et *in vivo* sur un modèle murin (Kang *et al.*, 2020). De même, les vésicules de *L. plantarum* ont la capacité de réduire la perte d'intégrité épithéliale induite *in vitro* (Kuhn *et al.*, 2020). Ainsi, en stimulant la fonction barrière de l'épithélium, les vésicules des lactobacilles contribuent au renforcement du système immunitaire intestinal de l'hôte.

### **Modulation du système immunitaire inné et adaptatif**

Le microbiote intestinal influence de manière significative le répertoire des IgA sécrétées par les lymphocytes B effecteurs (ou plasmocytes). Les IgA font partie des molécules du système immunitaire qui sont impliquées dans le maintien de l'équilibre homéostatique, en assurant la protection contre le microbiote et les infections bactériennes (Pabst and Izcue, 2022; Wilmore *et al.*, 2018).

De manière intéressante, il a été montré que les vésicules de plusieurs lactobacilles sont capables de stimuler la production d'IgA (Harrison *et al.*, 2021; Kurata *et al.*, 2022; Miyoshi *et al.*, 2021; Yamasaki-Yashiki *et al.*, 2019). En particulier, les MVs libérées par *L. sakei* entraînent la production d'IgA par les plaques de Peyer chez la souris. Cette production d'IgA est associée à l'activation des récepteurs de l'immunité innée Toll-like 2 (TLR2) qui reconnaissent des composants de la paroi cellulaire présents dans les MVs. (Yamasaki-Yashiki *et al.*, 2019, p. 1; Miyoshi *et al.*, 2021).

De même, les MVs libérées par *L. rhamnosus* contiennent des acides lipoteichoïques qui activent le récepteur TLR2 induisant ainsi l'expression de cytokines anti-inflammatoires par les cellules immunitaires (Champagne-Jorgensen *et al.*, 2021b).

La présence de PAMPs dans les vésicules de lactobacilles (ex. peptidoglycane, acides teichoïques) explique ainsi leur capacité à activer des récepteurs de l'immunité innée et à moduler les réponses immunitaires de l'hôte (Kurata *et al.*, 2022; Morishita *et al.*, 2022).

L'activité immunomodulatrice des vésicules de lactobacilles a été démontrée à de nombreuses reprises sur des cellules épithéliales et sur des cellules présentatrices d'antigènes (macrophages, cellules dendritiques). Notamment, les vésicules de *L. plantarum* ont une activité anti-inflammatoire *in vivo* et *in vitro* en empêchant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Hao *et al.*, 2021; Kim *et al.*, 2018; Kuhn *et al.*, 2020). Des observations similaires ont été réalisées avec les vésicules de *L. rhamnosus*, *L. reuteri* et des vésicules de lactobacilles isolées du kéfir (Kang *et al.*, 2020; Mata Forsberg *et al.*, 2019; Seo *et al.*, 2018; Tong *et al.*, 2021). De plus, les vésicules de *L. plantarum* agissent également en orientant les macrophages vers une polarisation M2 anti-inflammatoire (W. Kim *et al.*, 2020). L'orientation de cellules dendritiques vers un profil tolérogène a également été observée à l'issue de gavages de souris avec des vésicules de *L. rhamnosus* (Al-Nedawi *et al.*, 2015). Enfin, il a été montré que les vésicules de *L. paracasei*, *L. casei*, *L. reuteri* agissent en stimulant la production de cytokines anti-inflammatoires et en atténuant l'expression de cytokines pro-inflammatoires (Choi *et al.*, 2020b; Hu *et al.*, 2021; Müller *et al.*, 2021; Vargoorani *et al.*, 2020).

Notons qu'il existe également un certain nombre de publications contradictoires mettant en évidence l'activité pro-inflammatoire des vésicules de *L. casei* et de *L. plantarum* (Bäuerl *et al.*, 2020; Morishita *et al.*, 2022, 2021). Ces différences peuvent probablement s'expliquer par la variabilité des vésicules produites par les différentes souches bactériennes et les différentes conditions de culture. Ces résultats appuient une nouvelle fois l'idée qu'il est difficile de généraliser les activités de vésicules produites par une souche donnée.

### **Protection contre les pathogènes**

Il existe un certain nombre de publications montrant les effets protecteurs des vésicules de lactobacilles contre des pathogènes. Ces effets protecteurs sont dus aux modulations du système immunitaire (Kim *et al.*, 2018; Mata Forsberg *et al.*, 2019) ou à la réduction de l'interaction des pathogènes avec les cellules hôtes (Costantini *et al.*, 2021; Ñahui Palomino *et al.*, 2019).

Par exemple, les MVs de *L. plantarum* protègent de l'eczéma atopique en réduisant l'inflammation cutanée provoquée par les vésicules de *Staphylococcus aureus* (Kim *et al.*, 2018).

De manière remarquable, les MVs de lactobacilles isolées de la flore vaginale sont capables d'inhiber l'infection par le VIH-1 en empêchant l'attachement des virus à leurs cellules cibles. Il a notamment été montré que l'effet inhibiteur des MVs est lié à la présence de protéines de surfaces (Costantini *et al.*, 2021; Ñahui Palomino *et al.*, 2019).

### **4. Applications et autres effets notables des MVs de lactobacilles**

De nombreuses activités bénéfiques ont été attribuées aux vésicules de lactobacilles. Notamment, les MVs de lactobacilles ont été associées à des effets anti-tumoraux (Behzadi *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2017; Shi *et al.*, 2021), à des effets de type antidépresseur (Choi *et al.*, 2019), à la protection contre des lésions cérébrales ischémiques (Z. Yang *et al.*, 2022), à la réduction du vieillissement de la peau (Jo *et al.*, 2022), à la motilité intestinale (West *et al.*, 2020) ou encore à la régulation de la sécrétion d'insuline par les îlots de Langerhans (Teixeira *et al.*, 2022).

Par ailleurs, il a été montré que les MVs de lactobacilles peuvent être utilisées pour modifier génétiquement des cellules eucaryotes. Des gènes codant pour la GFP et des micro ARN ont ainsi pu être transportés et délivrés dans le cytoplasme des cellules hôtes par des vésicules de *L. reuteri* modifiées génétiquement (S.-I. Kim *et al.*, 2022).

Enfin, plus largement, l'expression et l'encapsulation de protéines dans des MVs de lactobacilles représentent un fort potentiel avec de multiples applications dans l'alimentation et les thérapies cliniques.





## OBJECTIFS DE LA THESE

L'étude des MVs de lactobacilles est une thématique qui suscite un fort intérêt depuis les 5 dernières années en raison de la diversité des rôles attribués à ces structures et du potentiel bénéfique de certaines souches probiotiques. En particulier, la bactérie *Lacticaseibacillus casei* BL23 est une souche connue pour ces activités immunomodulatrices et antimicrobiennes contre des agents pathogènes (Archambaud *et al.*, 2012 ; Foligne *et al.*, 2007; Rochat *et al.*, 2007). Toutefois, malgré l'intérêt accordé aux MVs de lactobacilles, les mécanismes de biogenèse et les rôles exercés par ces vésicules restent largement méconnus. En 2017, une étude montre pour la première fois que *L. casei* BL23 libère des vésicules membranaires et propose les premiers éléments de caractérisation physico-chimique de ces vésicules (Domínguez Rubio *et al.*, 2017). Notamment, les auteurs ont pu identifier dans les fractions vésiculaires la présence de protéines aux activités probiotiques telles que des hydrolases du peptidoglycane (LCABL\_00230 et LCABL\_02770) (Bäuerl *et al.*, 2010) et la protéine GroEL (Rieu *et al.*, 2014). Par ailleurs, la présence de séquences phagiques dans le génome de *L. casei* BL23 (Dieterle *et al.*, 2016) et l'induction spontanée de prophages (Mazé *et al.*, 2010) suggèrent leur contribution dans la production de vésicules comme précédemment observées chez *Bacillus subtilis* (Toyofuku *et al.*, 2017a). L'implication des prophages dans la biogenèse pourrait ainsi expliquer la détection de nombreuses protéines phagiques dans les vésicules de *L. casei* BL23 (Domínguez Rubio *et al.*, 2017). Dans ce contexte, ma thèse a pour objectif de caractériser, d'identifier les mécanismes de biogenèse et d'étudier les rôles des vésicules produites par la bactérie à Gram positif *L. casei* BL23.

Objectifs 1 et 2 : Caractériser les MVs libérées par *L. casei* BL23

Le premier objectif de mon projet de thèse est d'approfondir la caractérisation des vésicules produites par la bactérie *L. casei* BL23. Une étude microscopique a été menée (microscopie électronique, microscopie confocale) afin de mettre en évidence la production des MVs par *L. casei* BL23. De plus, un protocole de purification des vésicules a été mis au point et plusieurs paramètres ont été étudiés (taille et composition protéique des vésicules).

Objectif 2 : Élucider les mécanismes de biogenèse des MVs de *L. casei* BL23

Sur la base des données de caractérisation, nous avons ensuite souhaité élucider les mécanismes de biogenèse mis en jeu dans la production des vésicules de *L. casei* BL23. Notamment, la contribution des phages dans la biogenèse des MVs de *L. casei* BL23 a été étudiée à l'aide de mutants obtenus par mutagenèse dirigée.

Objectif 3 : Étudier les rôles exercés par les vésicules de *L. casei* BL23

Dans cette partie du travail, nous nous sommes principalement intéressés aux rôles probiotiques joués par les vésicules de *L. casei* BL23. En particulier, nous avons étudié l'impact des vésicules sur la formation de biofilm par plusieurs bactéries pathogènes et bactéries d'altérations. De plus, nous avons également souhaité identifier les déterminants moléculaires responsables des activités antibiofilms des vésicules de *L. casei* BL23. Pour ce faire, des vésicules de *L. casei* BL23 ont été soumises à divers traitements (enzymatique, physico-chimique) avant d'analyser leur activité ainsi que l'activité de vésicules issues de plusieurs mutants de *L. casei* BL23.

Enfin, l'activité immunomodulatrice des vésicules de *L. casei* BL23 a été évaluée en utilisant un modèle cellulaire de macrophages dérivés de monocytes (THP-1) stimulés par du lipopolysaccharide (LPS).



## RESULTATS

### Chapitre 1 : Biogenèse et caractérisation des MVs de *Lacticaseibacillus casei* BL23

#### 1. Article 1 : La biogenèse des vésicules membranaires de *Lacticaseibacillus casei* BL23

Titre : « Spontaneous Prophage Induction Contributes to the Production of Membrane Vesicles by the Gram-Positive Bacterium *Lacticaseibacillus casei* BL23 ».

David da Silva Barreira, Pierre Lapaquette, Julia Novion Ducassou, Yohann Couté, Jean Guzzo, Aurélie Rieu

(mBio, 2022, 13(5):e0237522. doi: 10.1128/mbio.02375-22)

Résumé :

La formation de vésicules membranaires (MVs) par les bactéries à Gram positif a bénéficié d'une attention croissante au cours des dix dernières années. Récemment, des mécanismes de biogenèse ont été proposés et impliquent la digestion de la paroi cellulaire par des hydrolases du peptidoglycane (PGHs) codées par des prophages ou des PGHs bactériennes induites par des stress ainsi que par l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane (PG) par des antibiotiques (ex. bêta-lactames). L'impact de ces mécanismes sur la formation de vésicules dépend largement de la souche et des conditions de croissance. À ce jour, aucune information sur la production de vésicules par les lactobacilles n'a été rapportée. Ici, nous avons cherché à caractériser les MVs libérées par la bactérie à Gram positif *Lacticaseibacillus casei* BL23 et avons également étudié les mécanismes impliqués dans la formation des vésicules. En utilisant la microscopie électronique, nous avons établi que la taille de la majorité des vésicules de *L. casei* BL23 était comprise entre 50 et 100 nm. De plus, nous avons montré que les vésicules étaient libérées de façon constante tout au long de la croissance de la bactérie dans des conditions de culture standard. La composition protéique des vésicules libérées dans le surnageant a été identifiée et un nombre significatif de protéines de prophages a été détecté. De plus, en utilisant une souche mutante portant un prophage PLE2 défectueux, nous avons pu montrer que l'induction spontanée et l'induction déclenchée par la mitomycine du prophage PLE2 contribuent à la production de MVs par *L. casei* BL23. Enfin, nous avons également démontré l'influence des prophages sur l'intégrité de la membrane des bactéries. Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent un rôle clé du prophage PLE2 dans la production de MVs par *L. casei* BL23 en absence ou en présence de stress génotoxiques.





# Spontaneous Prophage Induction Contributes to the Production of Membrane Vesicles by the Gram-Positive Bacterium *Lactocaseibacillus casei* BL23

David da Silva Barreira,<sup>a</sup> Pierre Lapaquette,<sup>a</sup> Julia Novion Ducassou,<sup>b</sup> Yohann Couté,<sup>b</sup> Jean Guzzo,<sup>a</sup> Aurélie Rieu<sup>a</sup>

<sup>a</sup>University Bourgogne Franche-Comté (UBFC), Institut Agro Dijon, Dijon, France

<sup>b</sup>University Grenoble Alpes, INSERM, CEA, UMR BioSanté U1292, CNRS, CEA, FR2048, Grenoble, France

**ABSTRACT** The formation of membrane vesicles (MVs) by Gram-positive bacteria has gained increasing attention over the last decade. Recently, models of vesicle formation have been proposed and involve the digestion of the cell wall by prophage-encoded or stress-induced peptidoglycan (PG) hydrolases and the inhibition of PG synthesis by  $\beta$ -lactam antibiotics. The impact of these mechanisms on vesicle formation is largely dependent on the strain and growth conditions. To date, no information on the production of vesicles by the lactobacilli family has been reported. Here, we aimed to characterize the MVs released by the Gram-positive bacteria *Lactocaseibacillus casei* BL23 and also investigated the mechanisms involved in vesicle formation. Using electron microscopy, we established that the size of the majority of *L. casei* BL23 vesicles ranged from 50 to 100 nm. Furthermore, we showed that the vesicles were released consistently throughout the growth of the bacteria in standard culture conditions. The protein composition of the vesicles released in the supernatant was identified and a significant number of prophage proteins was detected. Moreover, using a mutant strain harboring a defective PLE2 prophage, we were able to show that the spontaneous and mitomycin-triggered induction of the prophage PLE2 contribute to the production of MVs by *L. casei* BL23. Finally, we also demonstrated the influence of prophages on the membrane integrity of bacteria. Overall, our results suggest a key role of the prophage PLE2 in the production of MVs by *L. casei* BL23 in the absence or presence of genotoxic stress.

**IMPORTANCE** The last few decades have demonstrated that membrane vesicles (MVs) produced by microorganisms can have a wide variety of functions. This diversity places MVs at the crossroads of major research topics in current microbiology such as antibiotic resistance, horizontal gene transfer, cell communication, biofilm development, bacteriophage resistance, and pathogenesis. In particular, vesicles produced by probiotic strains have been shown to play a significant role in their beneficial effects. Thus, the study of vesicle biogenesis is a key element for promoting and improving their release. Overall, our results suggest a key role of spontaneous and mitomycin-triggered prophage induction in MV production by the Gram-positive bacteria *Lactocaseibacillus casei* BL23. This phenomenon is of great interest as prophage-induced MVs could potentially influence bacterial behavior, stress resistance, and vesicle functions.

**KEYWORDS** *Lactocaseibacillus casei*, membrane vesicles, membrane vesicle production, prophages, spontaneous prophage induction

Membrane vesicles (MVs) are spherical nanostructures enclosed by a lipid bilayer ranging from 20 nm to 400 nm in diameter. They were found to be produced by organisms of all three domains of life, namely, *Archaea*, *Bacteria*, and *Eukarya*, and can carry a diversity of components (1, 2). The composition of MVs is influenced by the organism that produces them and its physiological state, the mechanism of biogenesis, and environmental factors (1, 3, 4).

**Editor** Gustavo H. Goldman, Universidade de Sao Paulo

**Copyright** © 2022 da Silva Barreira et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Aurélie Rieu, aurelie.rieu@u-bourgogne.fr.

The authors declare no conflict of interest.

**Received** 30 August 2022

**Accepted** 13 September 2022

**Published** 6 October 2022

The release of bacterial MVs was first observed as early as 1966 in the Gram-negative bacteria *Escherichia coli* (5). Since then, research has mainly focused on studying Gram-negative vesicles as the production of vesicles by Gram-positive bacteria was considered unintuitive due to the presence of a thick peptidoglycan (PG) wall covering the bacteria. It took more than 20 years for the first clear mention of Gram-positive vesicles to appear in the literature (6, 7), and it is only recently that the production of vesicles by Gram-positive bacteria has received greater attention. The vesicles of Gram-positive bacteria have been found to carry a wide variety of cellular compounds, including proteins, lipids, and nucleic acids (8). Moreover, various roles have also been reported such as horizontal gene transfer, cell communication, antibiotic resistance, and virulence (3, 9).

To date, a limited number of studies have investigated the mechanism of MV biogenesis by Gram-positive bacteria (10–12). A recent study in *Bacillus subtilis* has shown that in treatment with a genotoxic agent (mitomycin C; MMC), the induction of a prophage-encoded holin-endolysin system triggered the formation of MVs through the digestion of the PG (12). Indeed, upon induction, the insertion of holins in the cell membrane allow endolysins to access the PG of the bacteria, while the hydrolase activity of endolysins create perforations in the bacterial wall. Thus, it is thought that the vesicles are formed by the extrusion of cytoplasmic membranes due to turgor pressure. In contrast to Gram-negative bacteria, the formation of vesicles does not lead to explosive cell lysis (13–15); instead, bacteria with impaired membrane integrity maintain their morphology while producing vesicles, a phenomenon called “bubbling cell death.” Similarly, another study has recently reported the role of prophage induction in vesicle release in MMC treatment in *Lactococcus lactis* (11). Several prophage-independent mechanisms of vesicle production have also been described in Gram-positive bacteria, including the inhibition of PG synthesis by  $\beta$ -lactam antibiotics (7, 16) and the digestion of the PG by the hydrolase activity of autolysins (17, 18).

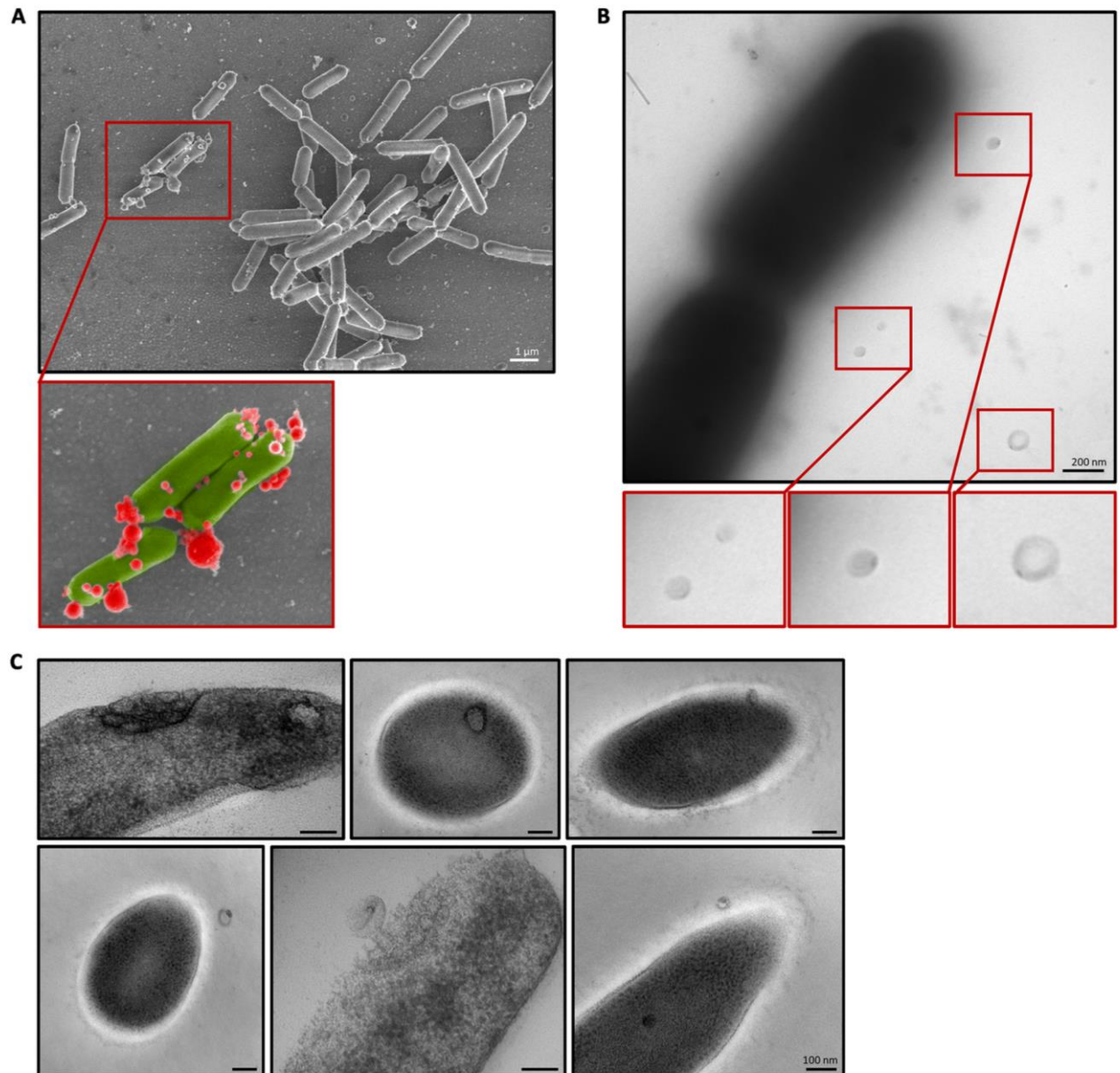
Several publications have shown that bacteria from the lactobacilli family produce membrane vesicles and different functions have been attributed to them, including antimicrobial activities (19–22), cell communication, and immunomodulation (23–29).

Lactobacilli are Gram-positive bacteria widely used in industrial food fermentation processes and are “generally recognized as safe” (GRAS). Some strains of lactobacilli are part of the intestinal microbiota and may have probiotic effects. The World Health Organization (WHO) has defined probiotics as “live microorganisms which, when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host” (30). Several probiotics have been demonstrated to enhance gastrointestinal health, in part by stimulating host immunity and inhibiting pathogen adherence to mucus and to intestinal epithelial cells (31, 32). Among probiotics, the dairy strain BL23 of the species *Lactisibacillus casei* (formerly known as *Lactobacillus casei*) is widely studied due to its anti-inflammatory effects (33), its ability to prevent experimental colitis in mouse models (34), and its role in host defense against pathogens (35). Recently, *L. casei* BL23 was found to release MVs (36) but the mechanisms involved in vesicle biogenesis remain unclear. Thus, we aimed to investigate the mechanisms involved in the production of MVs by *L. casei* BL23.

In the present study, we report the characterization of the MVs released by *L. casei* BL23 in standard growth conditions using electron microscopy and MS-based proteomic analysis. We also quantify the amount of MVs released in the supernatant during bacterial growth. Furthermore, we demonstrate the contribution of spontaneous and mitomycin-triggered prophage induction in the production of MVs by *L. casei* BL23. Finally, we provide evidence of interactions between several prophages in *L. casei* BL23.

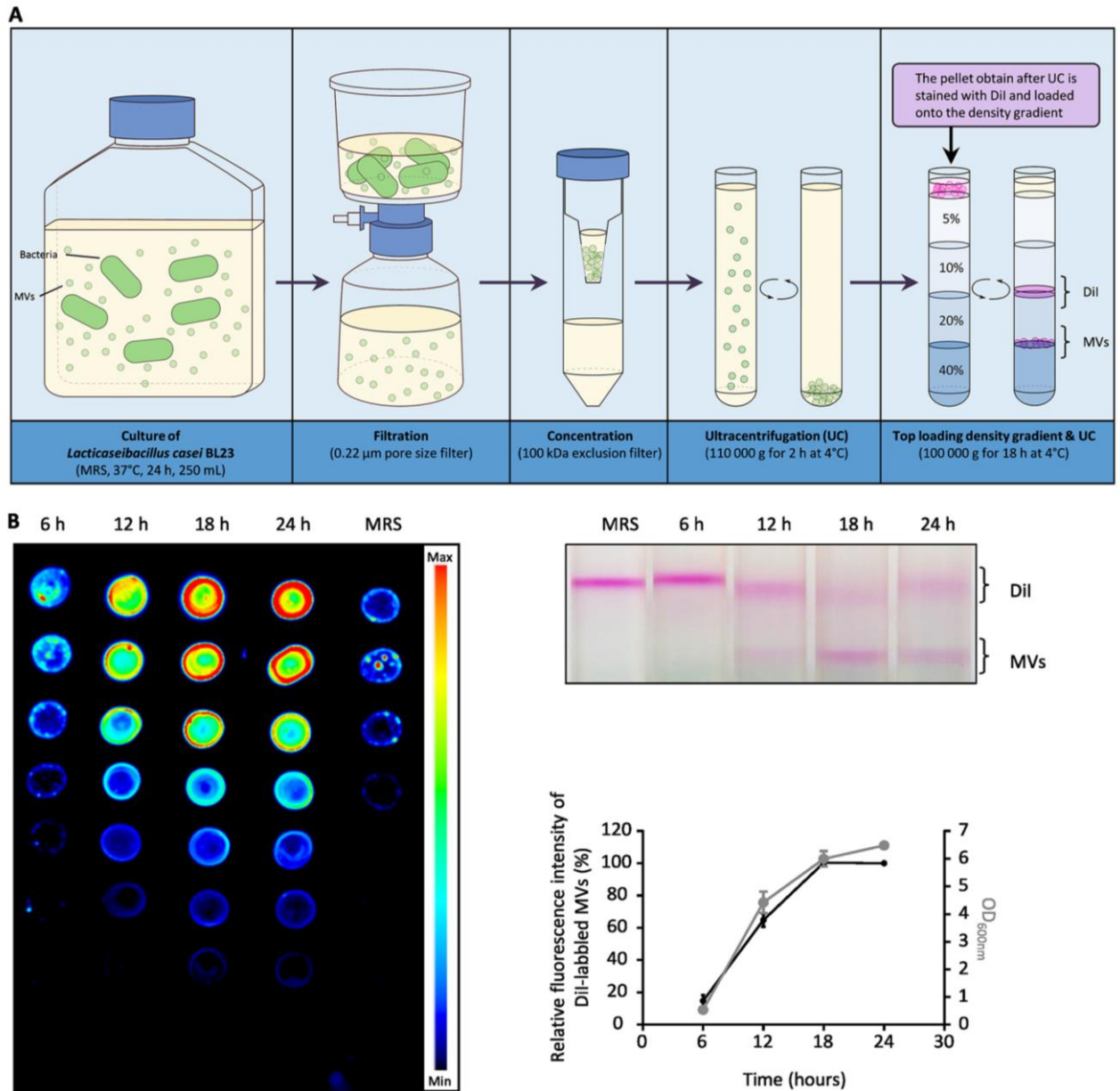
## RESULTS

***L. casei* BL23 releases MVs during the bacterial growth.** The presence of MVs in the culture medium of *L. casei* BL23 was first investigated using several electron microscopy methods (namely, scanning electron microscopy [SEM], negative-staining, and high-pressure freezing [HPF-FS] transmission electron microscopy [TEM]). Using SEM, spherical structures were observed in the medium and associated with the surface of bacteria after



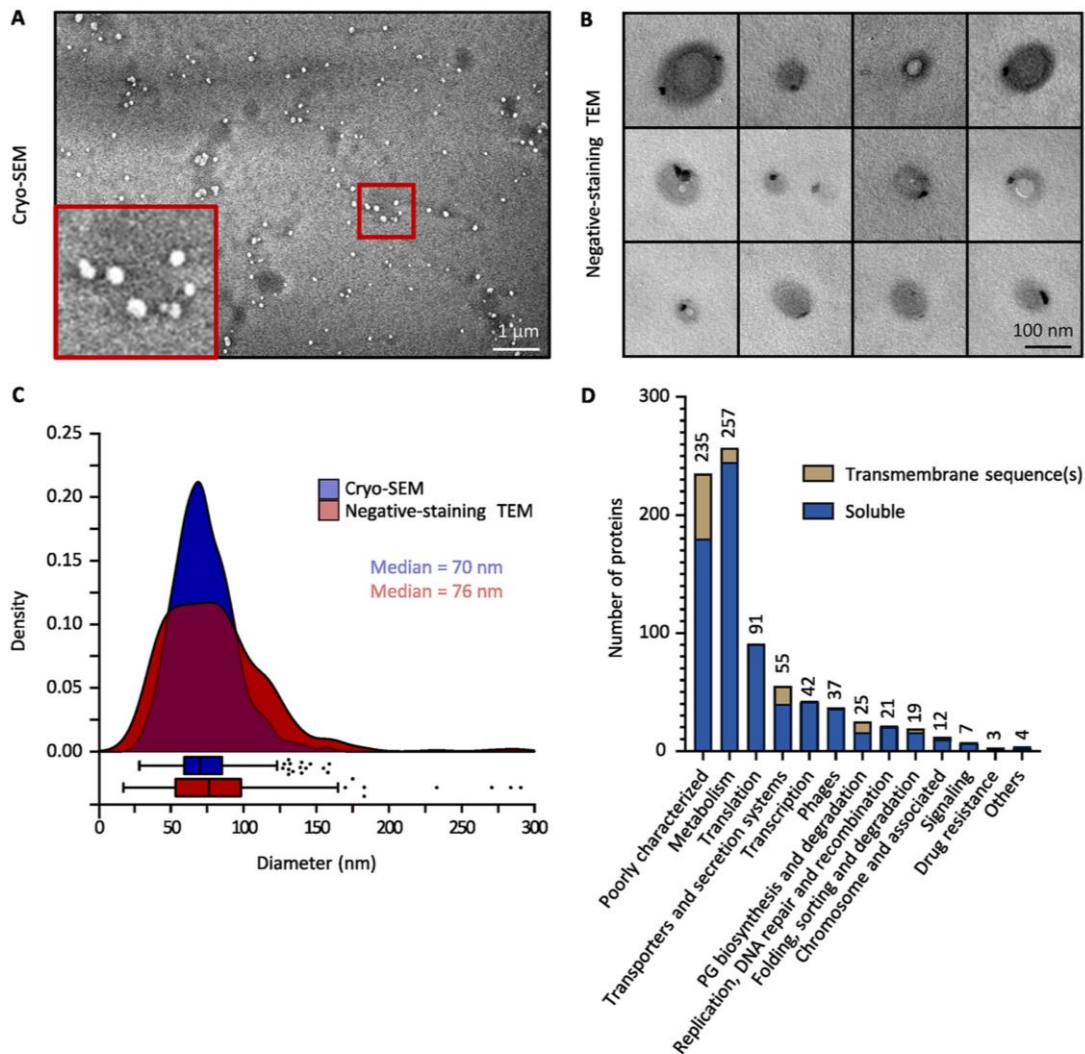
**FIG 1** MVs are observed inside, on the surface and in the vicinity of *L. casei* BL23. (A) SEM image of MVs associated with the surface of the bacteria. In the lower image, MVs are colored in red and the bacteria in green. (B) Negative-staining TEM images of MVs observed in the immediate vicinity of the bacteria. MVs are shown in the bottom panel. (C) HPF-FS TEM images of MVs closely associated with the bacteria.

24 h of culture (Fig. 1A). For easier identification and differentiation, these structures were colored in red and bacteria were colored in green in the zoomed-in view (Fig. 1A). MVs were also observed next to the bacteria by negative-staining TEM (Fig. 1B). Surprisingly, all the MVs presented a more contrasted spot at one pole. Using HPF-FS TEM, we also observed vesicles inside the cytoplasm, associated with the cytoplasmic membrane, the cell wall, and in the culture medium outside the cells (Fig. 1C). Interestingly, some bacteria presented clusters of vesicles embedded in the bacterial envelope (Fig. 1C). Overall, these results suggest *L. casei* BL23 produce MVs associated with the bacterial envelope and released into the culture medium. It is noteworthy that only a small proportion of bacteria were found to be associated with vesicles, suggesting that in standard growth conditions (i.e., MRS medium at 37°C) few bacteria produce MVs.



**FIG 2** Most vesicles are released during the growth of the bacteria within the first 24 h of culture. (A) Schematic representation of the MV quantification protocol. After several steps of centrifugation, filtration, concentration, and ultracentrifugation, the MVs are stained with DiI before being loaded on the iodixanol density gradient. (B) After 6, 12, 18 and 24 h of growth, the amount of purified DiI-labeled MVs collected from the growth medium were compared. The left and the top right images show the fluorescence intensity of the DiI-labeled MV fractions collected at each time point and the corresponding gradients, respectively. The graph shows for each time point the relative amount of fluorescence emitted by the DiI-labeled MVs collected and the OD<sub>600nm</sub> of the bacterial culture.

Next, we aimed to determine the kinetics of MV production during the first 24 h of bacterial growth. To achieve this, the MV quantification protocol described in Fig. 2A was used to quantify the vesicles released in the supernatant at 6 h, 12 h, 18 h, and 24 h of growth. This method is based on the purification of DiI-labeled vesicles by density gradient ultracentrifugation and the quantification of fluorescence intensity emitted by the vesicles. The quantification relies on the linear relationship between the amount of labeled vesicles and the intensity of fluorescence emitted (Fig. S1). We found that the quantity of DiI-labeled MVs increased mainly between 6 h and 18 h of



**FIG 3** Purified MVs from *L. casei* BL23 are characterized for size and protein composition. (A) Cryo-SEM image of purified MVs. (A, inset) Zoomed-in view of the Cryo-SEM image. (B) Negative-staining TEM images of purified MVs. (C) The size distribution of purified MVs was obtained by analysis of the Cryo-SEM (830 vesicles) and the negative-staining TEM (533 vesicles) images. Vesicle sizes were obtained using the image analysis software Fiji (37). (D) Functional classification of *L. casei* BL23 MV proteins.

growth (Fig. 2B). Conversely, between 18 h and 24 h, the amount of vesicles in the supernatant no longer increased (Fig. 2B). Moreover, we noticed a clear parallel between the growth of *L. casei* BL23 ( $OD_{600nm}$ ) and the quantity of MVs in the supernatant (Fig. 2B). These observations suggest that MVs were released consistently throughout the growth of the bacteria with the amount MVs released reflecting the amount of cell in the medium.

**The size and protein composition of the MV produced by *L. casei* BL23 were characterized by electron microscopy and proteomics.** To analyze the MVs released by *L. casei* BL23 into the supernatant, the vesicles were concentrated and purified after density gradient ultracentrifugation. The purified vesicles were then observed by electron microscopy (cryo-SEM, negative-staining TEM).

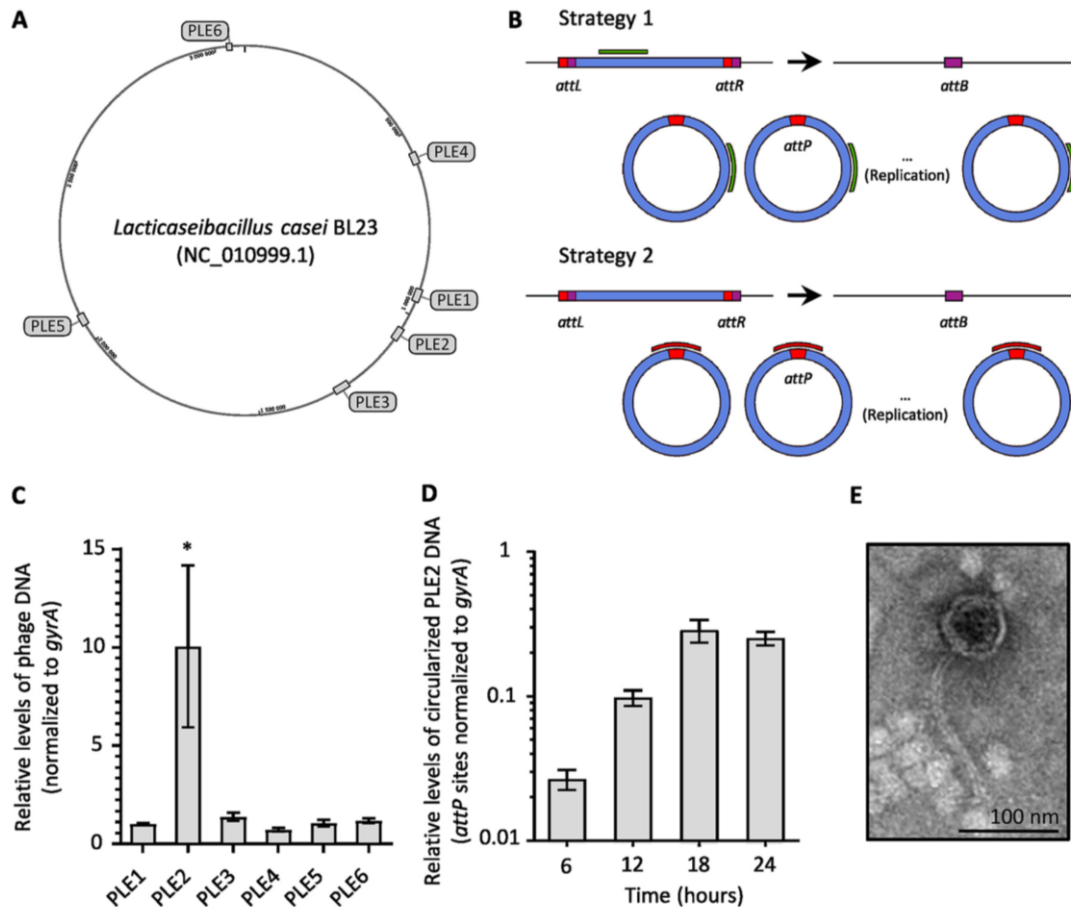
Using cryo-SEM, we observed spherical structures in the sample containing purified MVs (Fig. 3A) while no structures were found in the negative control (Fig. S2). The negative control corresponds to the fraction collected after carrying out the purification protocol on the culture medium alone (i.e., MRS medium) (Fig. S2). Consistent with our

previous negative-staining TEM observations (Fig. 1B), we noticed that purified vesicles were also found to be polarized with a contrasted spot at one pole (Fig. 3B). Importantly, no phage heads, tails, or full phage particles were observed in the purified MV samples while analyzing negative-staining TEM images. The cryo-SEM images and the negative-staining TEM images were further analyzed with the Fiji software (37) to establish the size distribution of the purified MVs (Fig. 3C). With both microscopy methods, we saw that the size of MVs followed a normal distribution with the majority of the vesicles ranging from 50 nm to 100 nm (Fig. 3C). These results demonstrated that the purification protocol used allowed obtaining purified vesicles which were similar to the structures previously observed near the bacteria (Fig. 1B and C).

To further explore the MVs produced by *L. casei* BL23, we then decided to examine the protein composition of the purified vesicles. MS-based proteomic analyses were performed on them and the proteins detected are listed in the Table S1. The functional classification of the proteins detected was obtained using the Kegg (38) and Uniprot (39) databases (Fig. 3D). *L. casei* BL23 vesicles contain a majority of soluble proteins, including several metabolic enzymes as well as translation and transcription associated proteins (Fig. 3D). In addition, it is interesting to note the presence of many proteins associated with the chromosome in the MV fraction, such as DNA replication, DNA repair, and DNA recombination proteins (Fig. 3D). We also detected a number of proteins associated with PG biosynthesis, protein folding, protein sorting, and protein degradation (Fig. 3D). Using the Phobius software (40), the presence of transmembrane sequences was predicted in 13% of all the proteins detected in the vesicular fraction. Noticeably, 37 proteins encoded by prophage sequences were identified in the vesicular fraction (Fig. 3D).

**The prophage PLE2 replicates its DNA and express proteins during the growth of *L. casei* BL23.** The identification of phage proteins in the vesicular fraction of *L. casei* BL23 suggests a possible role of prophages in the biogenesis of the MVs. To examine the role of prophages, we used the Phaster software (41) to predict the presence of prophage sequences in the chromosome of *L. casei* BL23. Six putative prophages were detected. The prophages PLE1 to PLE4 were described previously by Dieterle et al. (42). Our analysis predicted two more prophage sequences that we named PLE5 and PLE6 (Fig. 4A; Table 1). Surprisingly, proteins encoded by all the predicted prophage sequences were detected in the vesicular fraction. However, the majority of the phage proteins were encoded by the prophages PLE1, PLE2, and PLE3 with 7, 10, and 11 proteins detected, respectively (Fig. S3A and B).

To determine whether the predicted prophages were able to replicate during the 24 h of culture, quantitative PCR (qPCR) were performed using primers designed to amplify a small prophage sequence as depicted in Fig. 4B. For each prophage, the amplified sequence is found in both the integrated form of the phage (prophage) and in its circularized form (strategy 1; Fig. 4B). This strategy was used because the phage attachment-sites (*attP*) were not known for all six putative prophages. The qPCR results showed that after 24 h of culture, there was a 10-fold increase in the PLE2 sequences compared with the bacterial reference sequences *gyrA* while no significant difference was observed for the other putative prophages. These results suggest the prophage PLE2 is the main prophage to replicate its genome during the first 24 h of growth (Fig. 4C). To further study the replication of PLE2, we used qPCR to amplify the *attP* site of PLE2 at four different time points during the growth of *L. casei* BL23 (strategy 2; Fig. 4B). Phage PLE2 replicated its DNA mostly before the first 18 h of bacterial growth (Fig. 4D). After 18 h, the quantity of PLE2 DNA did not increase (Fig. 4D). We also noticed the dynamics of phage replication was similar to the bacterial growth curve and the release of MVs (graph in Fig. 2B). This result suggests a relationship between phage replication and the release of MVs. Finally, we wondered if prophage PLE2 was able to produce complete phage particles. To answer this question, we treated *L. casei* BL23 with a DNA damaging agent (mitomycin C [MMC]) in the early exponential phase ( $OD_{600nm} = 0.3$  to  $0.4$ ) and looked for phage particles after purification by CsCl density gradient using negative-staining TEM. As previously described by Dieterle et al. (42), the phage particles observed had the morphological characteristics



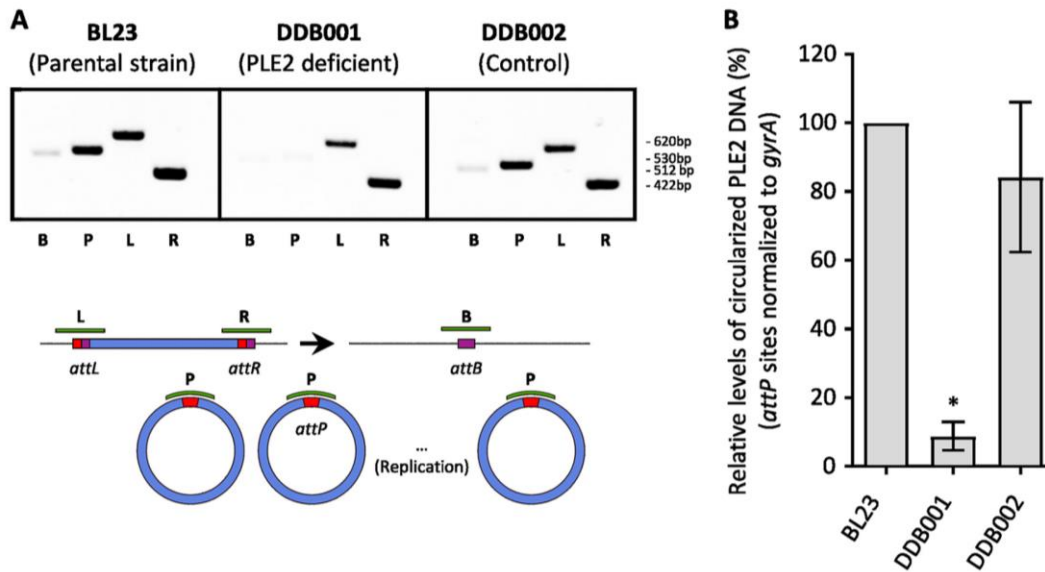
**FIG 4** One out of the six predicted prophages in *L. casei* BL23 genome was able to replicate during the first 24 h of growth. (A) The position of six prophages in *L. casei* BL23 genome were predicted using the Phaster software. (B) Schematic drawings of the two strategies used to quantify prophage replication. Upon entry into the lytic pathway, the phage genome is replicated and the prophage excision generates *attB/attP* sites. Either a sequence within the prophage genome (green; strategy 1) or the *attP* sequence (red; strategy 2) is amplified and compared using qPCR with a bacterial genome sequence (*gyrA*). The bacterial (*attB*), phage (*attP*), and prophage (*attL* and *attR*) attachment-site sequences are indicated with colored boxes. (C) Relative quantification of the six putative phage genomes after 24 h of culture, using the qPCR strategy 1. (D) Quantification of the circularized PLE2 genome during the first 24 h of culture, using the qPCR strategy 2. (E) Negative-staining TEM images of purified PLE2 particles. After induction by MMC (400 ng/mL) at exponential growth phase ( $OD_{600nm} = 0.3$ ), cells were incubated for 24 h before purification of phage particles by CsCl density gradient.

of the *Siphoviridae* family (Fig. 4E) (43). The virions had long thin tails which seemed flexible, and icosahedral heads of about 70 nm.

**A *L. casei* BL23 strain harboring a deficient PLE2 prophage was obtained by insertional mutagenesis.** Based on previous publications establishing a link between prophage induction and vesicle release (10–12), we wanted to test whether the prophage PLE2 could be involved in vesicle production during the growth of *L. casei* BL23.

**TABLE 1** Predicted prophage sequences in the chromosome of *L. casei* BL23 (NC\_010999.1) using the Phaster software

Region	Name	Region length (Kb)	Region position
1	PLE4	31.5	557,260 to 588,824
2	PLE1	34.1	928,671 to 962,821
3	PLE2	35.8	1,042,493 to 1,078,311
4	PLE3	46	1,248,493 to 1,294,544
5	PLE5	30.7	2,047,882 to 2,078,675
6	PLE6	13.6	3,031,592 to 3,045,245

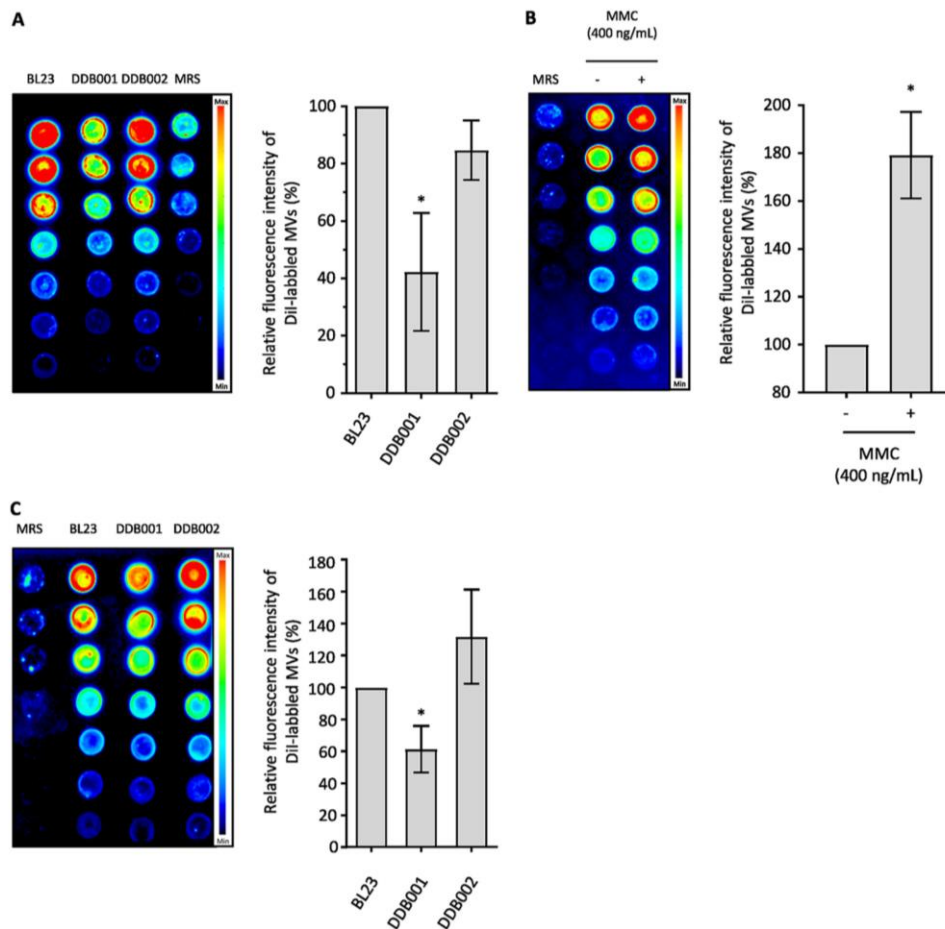


**FIG 5** Construction of a *L. casei* BL23 strain harboring a PLE2 excision-deficient mutant. The replication of the phage PLE2 in the parental strain *L. casei* (BL23) is compared with the PLE2 deficient strain (DDB001) and with the control strain (DDB002) using PCR (A) and qPCR (B). The DDB001 strain was obtained by insertion of the pRV300 plasmid into the PLE2 prophage gene *LCABL\_10980* (encoding a DNA primase). The DDB002 control strain was obtained by insertion of the pRV300 plasmid into a noncoding region. (A) For each strain, all attachment-site sequences were amplified by PCR and analyzed in a 1% agarose gel. (B) Comparison of the levels of circularized PLE2 in the parental, DDB001 and DDB002 strains using strategy 2 presented in Fig. 4B.

To this end, we constructed a strain named DDB001 carrying a mutant of prophage PLE2. The mutant was obtained by integration of a nonreplicative plasmid into the prophage gene *lcabl\_10980*, encoding a DNA primase (position of the plasmid is indicated by a red triangle in Fig. S3B). A control strain named DDB002 was also obtained by the insertion of the plasmid into an intergenic region of *L. casei* BL23 (Table S2). The plasmid insertion had no significant effect on the growth of strains DDB001 and DDB002 compared with the parental strain (Fig. S4A). In order to investigate the effect of mutagenesis on PLE2 replication, we used PCR to amplify the attachment sites *attB*, *attP*, *attL*, *attR* (named, respectively, B, P, L, and R) as described in Fig. 5A. Sites *attL* and *attR* can only be amplified by PCR if PLE2 is integrated in the chromosome of *L. casei* BL23. Conversely, the site *attB* is amplified only after the excision of the prophage while site *attP* is amplified after both the excision and circularization of the prophage genome (Fig. 5A). The PCR profiles obtained for the parental strains BL23 and the control strain DDB002 are similar. Bands corresponding to the amplification of the four attachment sites were observed, indicating that, within the bacterial population, both integrated and circularized forms of PLE2 were present. In contrast, for the DDB001 strain (PLE2 deficient), only the *attL* and *attR* amplicons were observed indicating that the mutation prevents excision of the PLE2 prophage (Fig. 5A). qPCRs were also performed to compare the levels of circularized PLE2 genome between the three strains (Fig. 5B). The *attP* site of PLE2 was amplified with the primers described in strategy 2 of the Fig. 4B. Consistently, we saw a significant decrease of the *attP* site in the DDB001 strain compared with the parental and the control strain (Fig. 5B). Finally, we examined the impact of mutagenesis on the replication of the other putative prophages by qPCR and no impact was observed in the standard growth condition (Fig. S4B).

**The replication of the PLE2 prophage leads to the production MVs by *L. casei* BL23.** To investigate the contribution of the prophage PLE2 in MV production, we compared the quantity of MVs released by the strain DDB001 (harboring a deficient PLE2 prophage) to the parental strain and the control strain DDB002 (Fig. 6A). In order to achieve this, the MVs released in the supernatant were purified and labeled for quantification after 24 h of culture as previously described (Fig. 2A). We measured a 2-fold decrease in fluorescence from the MV fraction of the strain DDB001 compared





**FIG 6** Contribution of the PLE2 prophage in the production of MVs with or without genotoxic stress. Relative quantification of the DiI-labeled MV fractions collected (A) from BL23, DDB001 and DDB002 strains after 24 h of culture or (B) from the BL23 strain treated with or without MMC. (C) Relative quantification of the DiI-labeled MVs collected from BL23, DDB001, and DDB002 strains treated with MMC. A final concentration of 400 ng/mL of MMC was added to the medium in the exponential phase ( $OD_{600nm} = 0.3$  to  $0.4$ ) and the MVs were collected after 24 h of culture. The left image and the right graph show, respectively, a representative nitrocellulose membrane and the quantification of fluorescence emitted by the DiI-labeled MVs purified from each strain.

with the fractions collected from the parental and DDB002 strains (Fig. 6A). This result showed the mutant DDB001 released fewer MVs than the parental and control strains, indicating that in the absence of PLE2 prophage replication, fewer MVs were released by *L. casei* BL23.

In order to confirm the previous observations, we decided to induce the entry of the prophage into the lysogenic pathway and compare the quantity of MVs released by *L. casei* BL23 with or without induction. Treatment with DNA-damaging agents such as UV light and MMC are commonly used in the literature to induce the switch of prophages to the lytic pathway. We chose to treat the bacteria in the early exponential phase ( $OD_{600nm} = 0.3$  to  $0.4$ ) with 400 ng/mL of MMC. After 24 h of culture with or without MMC, the levels of prophage replication and the level of MVs released in the supernatant by *L. casei* BL23 were quantified. Compared with the nontreated condition, twice as much fluorescence was emitted by the MV fraction collected from the bacteria treated with MMC (Fig. 6B). In addition, we noted the production of MVs was also affected after MMC treatment in the mutant strain DDB001 compared with the parental and the control strains (Fig. 6C). qPCRs were performed as described previously (strategy 1; Fig. 4B) to examine the impact of MMC treatment on the replication of all

the prophages (Fig. S5). As expected, MMC treatment induced an increase in the replication of the prophage PLE2. In addition, we also noticed a slight induction of prophages PLE1 and PLE3 in the treated condition. No significant impact was observed on the replication of other phages (Fig. S5).

Altogether, these results showed a strong relationship between the induction of PLE2 and the release of MVs, suggesting a contribution of PLE2 in the production of MV by *L. casei* BL23.

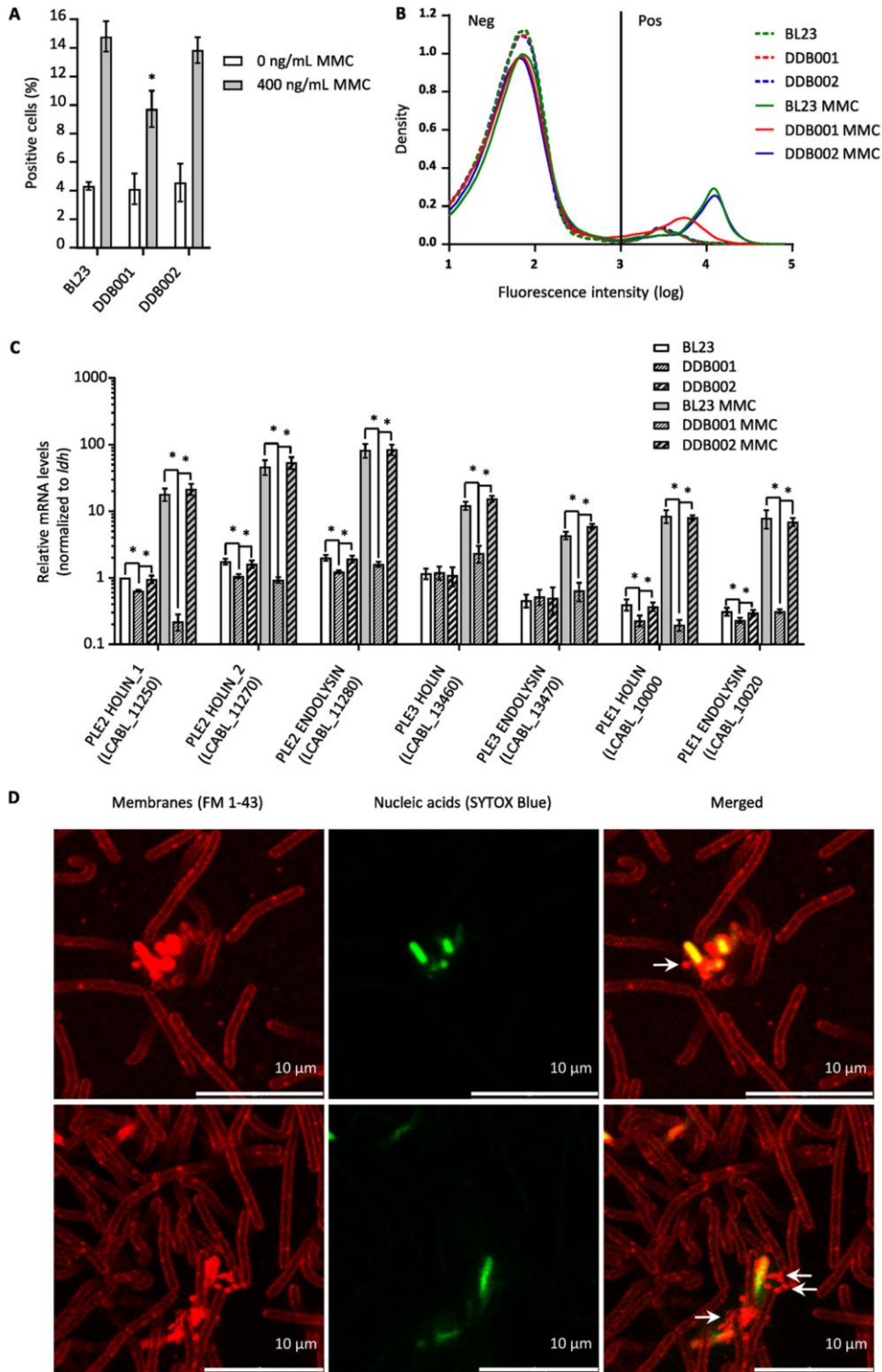
**The induction of the prophage PLE2 affects membrane integrity and promotes MV release.** Next, we wanted to investigate if the induction of the prophage PLE2 could impact the membrane integrity of the bacteria.

To measure the influence of prophage PLE2 on membrane integrity, we used flow cytometry to count the number of permeable cells in the population of the 3 strains (*L. casei* BL23, DDB001 and DDB002) treated with or without MMC (400 ng/mL). Permeable cells were stained with SYTOX Blue, a nucleic acid stain that penetrates cells with compromised cytoplasmic membranes (Fig. 7A and B). When treated with MMC, we observed a significant decrease in the number of positive cells in the DDB001 population compared with the parental and control populations, suggesting that there were fewer permeable bacteria in the population of the DDB001 strain (Fig. 7A). Furthermore, we also noticed that the fluorescence intensity of the DDB001 positive cells was lower than the other two strains, indicating that the positive DDB001 cells were less fluorescent and, therefore, less permeable (Fig. 7B). Remarkably, we also noticed that the MMC-treated cells were longer than the nontreated cells (Fig. S6A). In particular, the DDB001 treated cells were twice as long as the parental and control strains in the presence of MMC treatment and five times longer than the nontreated cells (Fig. S6A). Without MMC treatment, fewer positive cells were observed for all strains compared with the treated condition (Fig. 7A). In addition, no differences in cell permeability were observed between the different strains without MMC treatment (Fig. 7B and C). These results suggest that when cultured without stress, the number of permeable cells caused by the induction of PLE2 is too low to measure differences between strains.

Previous works on Gram-positive bacteria (11, 12) have shown that the disruption of the cytoplasmic membrane and the digestion of PG by the holin-endolysin systems of prophages are responsible for the production of MVs. The model proposes that the insertion of holins in the cytoplasmic membrane allows the PG hydrolases (endolysins) to access and digest the walls of the bacteria. Then, the perforation in the PG created by the endolysins leads to the budding of the membrane and the formation of vesicles.

In *L. casei* BL23 genome, holin-endolysin systems were predicted in prophages PLE1, PLE2, and PLE3 using the Phaster software. We would like to mention that two hypothetical holins referred to as holin\_1 (*lcabl\_11250*) and holin\_2 (*lcabl\_11270*) were predicted next to each other in the prophage PLE2. To clarify the contribution of each prophage on cell permeability, we quantified the expression of the predicted holin-endolysin systems in the three strains (BL23, DDB001, and DDB002) with or without MMC treatment. Interestingly, we observed that all the holin-endolysin systems were induced in the MMC-treated conditions (Fig. 7C). The holin (*lcabl\_11270*) and the endolysin (*lcabl\_11280*) of prophage PLE2 were the most expressed. Furthermore, no activation of the holin-endolysin genes were observed in the DDB001 strain with or without MMC treatment. These results show that none of the three predicted prophage holin-endolysin systems were expressed in the DDB001 strain, in accordance with the previous results showing a lower number of permeable cells in the bacterial population compared with the parental and control strains (Fig. 7A). These results suggest the mutation of the DNA primase (*lcabl\_10980*) in DDB001 affects the entry into the lytic pathway of PLE2 which might explain why expression of genes required for the lytic development of the prophage are not induced.

To further investigate the contribution of each prophage, qPCRs were performed to determine their level of replication in the three strains (BL23, DDB001, and DDB002) after MMC treatment, as described previously (strategy 1; Fig. 4B). Consistent with our previous results (Fig. S5), a significant increase in the replication of prophage PLE2 was observed in



**FIG 7** The PLE2 prophages affect the permeability of *L. casei* BL23 leading to the release of MVs. (A and B) BL23, DDB001, and DDB002 strains treated with or without MMC were analyzed by cytometry to quantify the proportion of permeable cells within each population. A final concentration of 400 ng/mL of MMC was added to the medium in the exponential phase ( $OD_{600nm} = 0.3$  to  $0.4$ ) and after 24 h of culture; permeable cells were labeled with a membrane- (Continued on next page)

the parental strain (BL23) and in the control strain (DDB002) compared with the nontreated condition (Fig. S6B). A slight increase in the PLE3 and PLE1 sequences was also observed in the treated condition for the parental and control strains as opposed to the DDB001 strain. (Fig. S6B). Furthermore, no induction of prophage PLE2 was observed in DDB001, with or without MMC treatment (Fig. S6B).

Altogether, the absence of PLE2 replication and the absence of holin endolysin expression explains the reduced number of permeable cells in the DDB001 strains. These observations are in agreement with the hypothesis that the induction of prophage PLE2 contributes to the formation of MVs through the alteration of membrane integrity and the digestion of PG.

To further support the results presented above, we finally wanted to investigate if permeable cells released MVs. In order to achieve this, bacteria were observed by confocal fluorescence microscopy after double staining (Fig. 7D). Permeable cells were labeled with SYTOX Blue and cell membranes were stained with the membrane probe FM 1–43. As expected, we noticed spherical membrane structures (red, indicated by white arrows) on the surface of permeable bacteria (green) (Fig. 7D). It is interesting to note that these observations are similar to the observation made using SEM (Fig. 1A). Indeed, in both the confocal microscopy images (Fig. 7D) and the SEM images (Fig. 1A), we can see bacterial cells covered with similar vesicular structures.

## DISCUSSION

The release of membrane vesicles by *L. casei* was first described in 1992 (7) and recent publications have also reported the production of MVs by this species (27, 36, 44, 45). Consistent with the literature, we showed by electron microscopy that *L. casei* BL23 produces MVs which were found in the cytoplasm, associated with the surface of the bacteria and free in the supernatant. We believe that the presence of intracellular vesicles could be due to the invagination of the cytoplasmic membrane, as described in *Streptococcus pneumoniae* (46) and in *Bacillus anthracis* (47). Interestingly, we also observed that some bacteria presented accumulations of internal vesicles located near the wall, comparable with the structures observed in *Bacillus anthracis* (47). Furthermore, with TEM we noticed that almost all the MVs presented a contrasted spot at one pole. This polarization could be a staining artifact or the result of a specific characteristic of *L. casei* BL23 vesicles. However, as yet, we have no element to explain this observation.

Several publications have demonstrated that the production of MVs is closely linked to the growth phase of the bacteria (48–50). For *L. casei* BL23, we showed that in standard conditions (i.e., MRS medium at 37°C), MV production occurs throughout the growth of the bacteria during the first 24 h of culture. In accordance with the literature, the size of the vesicles ranged from 20 nm to 200 nm with an average of 75 nm (27, 36).

To determine the protein content of *L. casei* BL23 vesicles, MS-based proteomics were used to analyze the vesicular fraction obtain after density gradient purification. A total of 810 proteins were detected, including a majority of metabolic, translational, and transcriptional proteins. Moreover, the presence of chromosome-associated proteins in the vesicular fraction, such as DNA polymerases and transcription factors, is consistent with previous results showing that the vesicles of *L. casei* BL23 carry nucleic acids (36). In addition, Rubio et al. showed that some proteins of *L. casei* BL23 were particularly enriched in the vesicles compared to the whole-cell extracts (36). The literature indicates that the enrichment of proteins in the vesicles can be due to either a specific mechanism of vesicle formation allowing protein selection, or a significant contribution

### FIG 7 Legend (Continued)

impermeable nucleic acid stain (SYTOX blue). The proportion of positive cells (A) and the distribution of fluorescence intensity (B) are shown for each strain. A minimum of  $4 \cdot 10^4$  events per replicate were analyzed. (C) The relative expression of the putative holin-endolysin systems was measured by reverse transcription-qPCR (RT-qPCR) in the BL23, DDB001 and DDB002 strains treated with or without MMC (400 ng/mL). Holin-endolysin systems were detected only in prophages PLE1, PLE2, and PLE3. (D) Confocal microscopy images of *L. casei* BL23 cells. After 24 h of culture, cell membranes were labeled with the lipophilic dye FM 1–43 (red) and permeable cells were stained with SYTOX blue (green).

of a subpopulation expressing a specific set of proteins (4, 51). The presence of capsid proteins in the vesicular fraction of *L. casei* BL23 supports the idea that vesicles were produced by a subset of the bacterial population in which prophages switched from the lysogenic to the lytic pathway.

Despite the absence of MMC induction, we detected proteins encoded by all the prophage sequences of *L. casei* BL23 in the vesicular fraction. This observation might be explained by the fact that bacteria are known to express and use proteins from cryptic and functional prophages for their own benefit (52, 53). Prophages are also known to express some regulatory genes when they are in their latent form (54). Interestingly, we noticed that most of the proteins detected were encoded by PLE2, PLE3, and PLE1 (10, 11, and 7 proteins, respectively), which is consistent with the finding that they are the only complete prophages (42). The interaction between PLE2, PLE3, and PLE1 for gene expression and replication support the idea that certain proteins encoded by one prophage could also be used by other prophages; thus, explaining the presence of many prophage proteins in the MVs of *L. casei* BL23.

In accordance with the literature (55), we showed prophage PLE2 is spontaneously induced during bacterial growth in standard culture conditions. In the absence of genotoxic stress, spontaneous induction was evidenced by the replication of PLE2 in the early and midexponential phase. No significant replication of PLE2 was observed in the stationary phase. Moreover, we observed that PLE2 was the only prophage to replicate its DNA in standard growth conditions. Spontaneous prophage induction (SPI) is a phenomenon known to impact the fitness of bacterial populations by promoting biofilm formation, horizontal gene transfer (HGT), and virulence (56–58). Notably, SPI has been reported in several lactic acid bacteria (10, 56, 57). Our work demonstrated that in the PLE2 deficient strain (DDB001), the absence of prophage replication was associated with a reduction in vesicle production. This result suggests that the spontaneous induction of PLE2 contributes to the release of MVs during bacterial growth. Moreover, the similarity between the PLE2 replication curve and the amount of MV released further supports this hypothesis. SPI was previously found to promote vesicle production in Gram-negative bacteria (49). For the first time, we proved that SPI also contributes to the production of vesicles in a Gram-positive bacterium.

The impact of MMC-induced prophages in the production of MVs has recently been shown in the Gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* (12), *Staphylococcus aureus* (16), and *Lactococcus* (10, 11). Upon treatment with a genotoxic agent, SOS gene activation in the bacteria triggers a switch of prophages to the lytic pathway. Activation of the SOS response also inhibits cell division and can be evidenced by significant cell filamentation (59–61). We observed that the cells of the mutant strain DDB001 were much longer than the parental and control strains in the presence of MMC. This increase in length can probably be explained by the absence of PLE2 induction in the DDB001 population. Consequently, we can assume that the absence of holin-endolysin expression in the DDB001 strain might explain the reduction in the amount of vesicles released compared with the parental and control strain.

In agreement with this observation, the MMC-triggered induction of PLE2 affected the membrane integrity of the parental and control strains, as evidenced by the increase in cell permeability. It has recently been shown that the expression of holin-endolysin systems is responsible for the alteration of membrane integrity in Gram-positive bacteria (11, 12). The PG hydrolase activity of endolysin creates “holes” in the cell wall of the bacteria which leads to the budding of vesicles. The bacteria eventually lose their membrane integrity and form what has been described as “ghost cells.” This mechanism of vesicle biogenesis has been called “bubbling cell death” (4, 12). Depending on the bacterial species, the perforations in the cell wall lead to budding or the formation of nanotubes (62). These species-dependent phenomena probably depend on turgor pressure as well as the thickness and diameter of the wall perforations.

We observed that without genotoxic stress, the cell permeability of the DDB001 strain was similar to that of the parental and control (DDB002) strains. Our

interpretation is that the number of permeable cells due to the spontaneous induction of the PLE2 prophage is much lower than the cell permeability due to prophage independent mechanisms, such as cell death. This result is consistent with the data indicating that spontaneous switching to the lytic state of PLE2 is estimated to occur in less than 0.7% of *L. casei* BL23 cells grown in standard conditions (42).

In *L. casei* BL23, prophages PLE1, PLE2, and PLE3 possess holin-endolysin systems which are all expressed upon MMC treatment. However, the PLE2 system is the most expressed after induction, and only the PLE2 holin (*lcabl\_11270*) was detected in the vesicular fraction in the absence of stress. It is noteworthy that the endolysin activity of genes *lcabl\_11280* (PLE2) and *lcabl\_10020* (PLE1) were previously characterized by Regulski et al. (63). Furthermore, no expression of the holin-endolysin system was detected upon MMC treatment in the mutant strain DDB001. Strikingly, we also noticed that in the DDB001 strain, the expression of the holin-endolysin systems of all three prophages was impaired, both in the absence or presence of genotoxic stress. Indeed, along with the PLE2 prophage, no induction of the holin-endolysin systems encoded by prophages PLE1 and PLE3 was observed in the presence of MMC treatment. Similarly, we observed that upon MMC treatment, prophages PLE3 and PLE1 were slightly induced in the parental strain. However, no replication of prophages PLE1 and PLE3 were observed in the DDB001 strain carrying a PLE2-deficient prophage. Taken together, these results prove that prophages PLE1 and PLE3 rely on prophage PLE2 for their replication. Both PLE3 and PLE1 prophages display a dependent behavior toward PLE2 comparable with satellite prophages, like the P4 bacteriophage (64, 65). Reciprocally, we suspect that PLE2 could also utilize the other prophage proteins to facilitate its lytic cycle. This idea is further supported by the presence of strongly similar DNA regions between PLE2 and PLE1 (Fig. S3B). Therefore, the mutual dependence that exists between *L. casei* BL23 prophages could explain why several phage proteins were found in the MV fraction. Based on our observations, we believe the alteration of membrane integrity upon MMC treatment primarily involves the induction of PLE2 and its lysin-endolysin system. In agreement with this hypothesis, we showed an increase in cell permeability coupled with an increase in vesicle release after PLE2 induction upon MMC treatment.

As proposed in the “bubbling cell death” model (4, 12), using confocal microscopy we observed that initially the release of vesicles by permeable “ghost cells” did not lead to morphological modifications of the bacteria. Indeed, both in confocal microscopy and TEM, we were able to observe bacteria releasing vesicles while maintaining their morphology. However, when the cells were severely damaged, they eventually exploded and lost their shape (12).

Interestingly, we saw the number of permeable cells in the DDB001 population with MMC was twice as high as the parental strain without MMC. This result reveals a reduction in membrane integrity independent of prophage induction in the DDB001 strain and suggests that MMC strongly impact the physiology of the bacteria. This impact was also evidence by the significant cell filamentation in the DDB001 strain compared with the parental and control strains. Other mechanisms such as activation of the SOS response could potentially induce the production of vesicles in a phage-independent manner (61), thus explaining the production of vesicles by the DDB001 strain.

Our results showed that the PLE2-deficient strain DDB001 releases vesicles when cultivated with or without genotoxic stress. We interpret this observation as an indication that phage-independent mechanisms might be involved in the biogenesis of these MVs. Prophage-independent mechanisms of biogenesis have been reported in several Gram-positive bacteria (16–18). Notably, the inhibition of PG synthesis by  $\beta$ -lactam antibiotics was described regarding their role in MV production in *Staphylococcus aureus* and *Lactobacillus casei* ATCC 7469 (7, 16), as well as in Gram-negative bacteria (66–68). In addition, the role of autolysins in the release of MVs has been proved in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* (17, 18). Autolysins are a type of PG hydrolases that digest the cell wall and can be potentially lethal for the producing bacteria (69). Remarkably, we found a large number of PG hydrolases in the vesicular fraction of *L. casei* BL23, among which were several autolysins (70). These enzymes could potentially explain how the DDB001 strain

produces vesicles independently of prophage induction. The presence of autolysin in the vesicles has been reported in many Gram-positive bacteria, including *Bacillus subtilis* (17), *Staphylococcus aureus* (71), *Mycobacterium tuberculosis* (72), *Listeria monocytogenes* (73), and *Streptococcus suis* (74). Furthermore, it has been shown that autolysins carried by MVs promote vesicle production from adjacent bacteria through the degradation of their cell wall (22, 75, 76).

**Conclusion.** In conclusion, our work has shown that spontaneous and MMC-triggered prophage induction contributes to the production of MVs by *L. casei* BL23 during cell growth. We have also gained new insights into the complex interactions that exist between the different prophages carried by the chromosome of *L. casei* BL23. The dependency of both PLE3 and PLE1 on prophage PLE2 strongly suggests their satellite nature. Vesicles were shown to play a large number of physiological roles: they are involved in stress resistance, biofilm formation (15, 77, 78), HGT (6, 9, 79), antibiotic (66–68, 71), and phage resistance (80). In this context, it will be relevant to further investigate whether the vesicles released after spontaneous and triggered prophage induction promote bacterial resistance to stresses.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains and growth conditions.** The bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table S2. Unless otherwise noted, *L. casei* strains were cultivated anaerobically in Man-Rogosa-Sharpe medium (MRS; Conda) at 37°C under static conditions for 24 h. *L. casei* mutants obtained by plasmid integration were selected in solid MRS (1.5% agar) and maintained in liquid MRS supplemented with 5 µg/mL of erythromycin. *Escherichia coli* DH5α was grown in LB medium at 37°C under agitation and was used as a host for cloning. *E. coli* transformants were selected on solid LB (1.5% agar) supplemented with 100 µg/mL of ampicillin.

**Construction of plasmids and mutant strains.** The construction of *L. casei* BL23 insertion mutants was adapted from Leloup et al. and Muñoz-Provencio et al. (81, 82). First, the internal fragment of the gene *LCABL\_10980* (encoding a DNA primase) and a noncoding region (accession number [NC\\_010999](#)) were amplified by PCR (Q5 High-Fidelity DNA polymerase NEB) using the *L. casei* BL23 genome as a template. The primers used for the PCR amplification are listed in Table S2. The amplified fragments were then cloned into the integrative vector pRV300 digested with EcoRI and HindIII/SacI restriction enzymes. The resulting recombinant plasmids (pRV001 and pRV002) were transformed in *L. casei* BL23 by electroporation with a GenePulser (Bio-Rad), as described in Posno et al. (83). Transformant bacteria were selected on MRS plates supplemented with 5 µg/mL of erythromycin. The correct integration of the plasmids was validated by PCR and sanger sequencing. As a result, the DDB001 mutant strain was created by integrating the plasmid (pRV001) into gene *LCABL\_10980*. Similarly, the DDB002 control strain was created by inserting the plasmid (pRV002) into the intergenic region of the *L. casei* BL23 genome, starting from base 2441051 to 2441492 (accession number [NC\\_010999](#)).

**Purification and quantification of MVs.** For MV purification, we used a protocol adapted from a previous study (84). *L. casei* culture (250 mL) was centrifuged at 4,000 × *g*, 4°C for 20 min. The supernatant was filtered through a 0.22-µm pore size filter (Nalgen Rapid-Flow) to remove remaining bacterial cells and concentrated by ultrafiltration at 4,000 × *g*, 4°C with 100 K Amicon Ultra-15 centrifugal filters (Merck Millipore). The concentrated supernatant was filtered through a 0.22-µm-pore-size filter before ultracentrifugation (UC) at 110,000 *g*, 4°C for 2 h. The UC pellet was resuspended in sterile PBS (1×) and loaded on top of an iodixanol gradient with layers of 5%, 10%, 20%, 40% of iodixanol (corresponding to about 1.054, 1.079, 1.127, 1.223 g/mL, respectively) and UC at 100,000 × *g* for 18 h at 4°C. The fraction containing the MVs was then collected and resuspended in PBS (1×) before a final UC at 110,000 × *g* for 2 h at 4°C. Please note that the presence or absence of MVs in the different fractions of the density gradient was checked using negative-staining TEM. MVs were only observed at the interface formed between the layers of 1.127 and 1.223 g/mL (corresponding to 20 and 40% of iodixanol).

To quantify the MVs, the first UC pellet containing MVs was stained for 30 min with 1% Vybrant Dil at 37°C. The Dil-labeled MVs were then loaded on top of an iodixanol gradient of 5% to 40% and UC at 100,000 × *g* for 18 h at 4°C. After the UC, the Dil-labeled MVs were carefully collected and used to prepare several dilutions and 5 µL of each dilution was then dropped into a nitrocellulose membrane (0.2 µm; Bio-Rad). From top to bottom 100%, 75%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.125% of each sample were spotted on the nitrocellulose membrane (0.2 µm; Bio-Rad), dried at room temperature, and then washed for 5 min in Tris-buffered saline (1×). The fluorescence emitted by the Dil-labeled MVs was quantified using the Odyssey Fc imager (LI-COR). The background level emitted by the spots of the negative control was subtracted from the fluorescence intensity of each sample according to their dilution. The negative control corresponds to the fraction collected after carrying out the purification protocol on the culture medium alone (i.e., MRS medium).

**Mass spectrometry-based proteomic analyses.** Three independent preparations of extracellular vesicles were analyzed. Proteins were solubilized in Laemmli buffer and heated for 10 min at 95°C. They were then separated by SDS-PAGE (4% to 12% NuPAGE, Life Technologies) and stained with Coomassie blue R-250 (Bio-Rad) before in-gel digestion using modified trypsin (Promega, sequencing grade) as described previously (85). For each replicate, the two very intense bands were prepared separately from

the rest of the sample. The resulting peptides were analyzed by online nanoliquid chromatography coupled to MS/MS (Ultimate 3000 RSLCnano and Orbitrap Exploris 480 for the second experiment, Thermo Fisher Scientific) using a 35-min gradient for intense bands and a 120-min gradient for the rest of the samples. To do this, the peptides were sampled on a precolumn (300  $\mu\text{m} \times 5$  mm PepMap C18, Thermo Fisher Scientific) and separated in a 75  $\mu\text{m} \times 250$  mm C18 column (Reprosil-Pur 120 C18-AQ, 1.9  $\mu\text{m}$ , Dr. Maisch). The MS and MS/MS data were acquired by Xcalibur (Thermo Fisher Scientific).

Peptides and proteins were identified by Mascot (version 2.7.0.1, Matrix Science) through concomitant searches against the Microscope database (86) (*Lactobacillus casei* BL23 taxonomy, April 2021 download), the Uniprot database (*Saccharomyces cerevisiae* S288c and *Bos Taurus* taxonomies, June 2021 download), and a homemade database containing the sequences of classical contaminant proteins found in proteomic analyses (keratins, trypsin, etc.). Trypsin/P was chosen as the enzyme and two missed cleavages were allowed. Precursor and fragment mass error tolerances were set at, respectively, 10 ppm and 20 ppm. Peptide modifications allowed during the search were: Carbamidomethyl (C, fixed), Acetyl (Protein N-term, variable), and Oxidation (M, variable). The Proline software (version 2.1) (87) was used for the compilation, grouping, and filtering of the results (conservation of rank 1 peptides, peptide length  $\geq 6$  amino acids, false discovery rate of peptide-spectrum-match identifications  $< 1\%$  [88], and a minimum of one specific peptide per identified protein group). Proline was then used to perform the compilation, grouping and spectral counting-based comparison of the identified protein groups.

Proteins identified in the contaminant, bovine, and yeast databases were discarded from the final list of identified proteins.

**Transmission electron microscopy.** Negative staining was performed on bacterial suspension, on purified MVs and on purified phage suspensions before observation by TEM at the DimaCell platform (<http://www.dimacell.fr/>). Then, 10  $\mu\text{L}$  of the sample was dropped on collodion-coated and carbon-stabilized nickel microscope grids and left for 3 min to allow the MVs, the bacteria, or the phages to bind. Excess liquid was gently blotted with Whatman paper and stained with 10  $\mu\text{L}$  of 1% (wt/vol) uranyl acetate solution for 10 s. The grid was dried and observed using a Hitachi H7500 transmission electron microscope (Hitachi Scientific Instruments Co., Tokyo, Japan) operating at 80 kV and equipped with an AMT camera driven by AMT software (AMT, Danvers, MA, USA).

Bacteria were also observed after HPF-FS and freeze substitution at the DimaCell platform (<http://www.dimacell.fr/>). Bacterial cultures were centrifuged at 4,000  $\times g$  for 5 min and the pellets were cryoimmobilized using a Leica high-pressure freezer (Leica Microsystems, Vienna, Austria). Frozen samples were then freeze-substituted with a Leica EM AFS (Leica Microsystems, Vienna, Austria) in pure acetone containing 2% (wt/vol) osmium tetroxide and 0.1% (wt/vol) uranyl acetate at  $-90^\circ\text{C}$  for 72 h. The temperature was gradually increased ( $5^\circ\text{C}/\text{hour}$ ) to  $4^\circ\text{C}$ , kept at  $4^\circ\text{C}$  for 2 h and then finally kept for 1 h at room temperature. The samples were washed for 1 h in acetone at room temperature and infiltrated in increasing concentrations of Epon acetone mixtures until pure Epon-812 was obtained. Finally, the samples were embedded and polymerized in Epon-812 at  $60^\circ\text{C}$  for 48 h. Ultrathin sections (50 nm to 60 nm) were obtained with a ultramicrotome UC61 (Leica Microsystems, Vienna, Austria) and placed on collodion-coated and carbon-stabilized nickel microscope grids. The sections were stained with 1% (wt/vol) uranyl acetate for 30 min.

**Scanning electron microscopy.** Bacteria were fixed in 2.5% glutaraldehyde for 30 min and 10  $\mu\text{L}$  of the fixed bacteria were then dropped onto a poly-L-lysine coated silicon wafer. After 30 min of drying, the bacteria were washed with water and postfixed in 4% osmium tetroxide for 1 h. After gentle washing in distilled water, cells were dehydrated through a graded series of ethanol baths (from 30% to 100%) and dried by the critical point drying (CPD) method using a Leica CPD 030. Finally, the samples were coated with a thin carbon layer using a CRESSINGTON 308R and observed with a JEOL JSM 7600F scanning electron microscope (JEOL Ltd.) at the DimaCell platform (<http://www.dimacell.fr/>).

Purified MVs were observed by cryogenic scanning electron microscopy (cryo-SEM) at the DimaCell platform (<http://www.dimacell.fr/>). Briefly, 10  $\mu\text{L}$  of MVs were dropped onto a poly-L-lysine coated silicon wafer and dried for 30 min. After gentle washing in distilled water, the sample was frozen under high pressure using a high-pressure freezing system (Leica EM HPM100, Leica Microsystems Inc., Austria) before sublimation at  $-95^\circ\text{C}$  for 5 min (Leica EM ACE900). Finally, MVs were observed with a JEOL JSM 7600F scanning electron microscope (JEOL Ltd.) operating in high-vacuum conditions at 2 kV accelerating voltage.

**Prophage induction and purification.** *L. casei* BL23 was inoculated at an  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  of 0.1 (corresponding to  $2.5 \times 10^8$  CFU/mL) in 250 mL of fresh MRS and incubated at  $37^\circ\text{C}$  until the exponential phase was reached ( $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.3$  to  $0.4$ ). Prophages were induced by the addition of MMC at a final concentration of 400 ng/mL. After 24 h of culture, bacteria cells and debris were removed by centrifugation at  $3,000 \times g$  for 10 min and filtration through a 0.45- $\mu\text{m}$  pore size filter. Phage particles were concentrated by ultrafiltration with 100K Amicon Ultra-15 centrifugal filters and purified on a Cesium chloride gradient. The phage interface was then collected and dialyzed with 50K Amicon Ultra-15 centrifugal filters against phage buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ).

**PCR and qPCR.** To examine phage replication by PCR or qPCR, bacterial DNA were prepared using an InstaGene Matrix kit (Bio-Rad). qPCR was performed with an iTaq Universal SYBR green Supermix (Bio-Rad) in a Real-Time PCR Detection System (CFX96, Bio-Rad) following the manufacturer's instructions. qPCRs were performed in two technical replicates and three biological replicates. Relative DNA quantity was calculated using the  $\Delta\text{C}_q$  method (18) after normalization by the bacterial sequence *gyrA* as an internal control. The data are presented as the fold change in DNA quantity relative to the endogenous reference *gyrA*. PCR was performed using the GoTaq DNA polymerase kit according to the recommendations of the supplier. PCR and qPCR primers are listed in Table S1.



**Reverse transcription-qPCR.** mRNA extractions were prepared using Direct-zol RNA MiniPrep (Zymo Research) followed by DNase I treatment (Roche). The absence of DNA contamination was checked by qPCR using 16 s rRNA primers. mRNAs were reverse transcribed into cDNA using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Thermo Fisher Scientific). qPCR was performed with an iTaq Universal SYBR green Supermix (Bio-Rad) in a Real-Time PCR Detection System (CFX96, Bio-Rad). Data were analyzed by the  $\Delta\Delta C_t$  method (89) after normalization by d-lactate dehydrogenase (*ldh*) as an internal control. The data are presented as the fold change in cDNA quantity relative to the amount of *lcabl\_11250* cDNA measured in the untreated parental strain (referred to as BL23). Each step was performed according to the manufacturers' instructions. The primers are listed in Table S2.

**Confocal laser scanning microscopy.** Bacteria were washed in PBS (1 $\times$ ) and adjusted to an OD<sub>600nm</sub> of 5 (corresponding to 1.25 10<sup>9</sup> CFU/mL). Cell membranes were labeled with 4  $\mu$ g/mL of FM 1-43 (Thermo Fisher Scientific) and the DNA of permeable cells were stained with 5  $\mu$ M SYTOX Blue (Invitrogen) for 10 min in the dark at room temperature. Samples were spotted on microscope slides with a thin layer of 1% agarose-PBS (Sigma-Aldrich), covered by a coverslip, and samples were directly observed at room temperature at the DimaCell platform (<http://www.dimacell.fr/>). Images were obtained using a Leica confocal SP8 inverted microscope with a 63 $\times$  oil immersion objective lens.

**Flow cytometry.** *L. casei* BL23 strains were grown in MRS at 37°C with or without MMC at a final concentration of 400 ng/mL. MMC was added to the medium during the exponential phase (OD<sub>600nm</sub> = 0.3 to 0.4). After 24 h of growth, bacteria were adjusted to 10<sup>6</sup> cells/mL and permeable cells were stained with 5  $\mu$ M SYTOX Blue for 10 min in the dark at room temperature. Bacteria were then analyzed by flow cytometry using a LSRFortessa Cell Analyzer (BD Biosciences) and data analyzed by R (packages flowCore and flowAI) at the Cytometrie platform (<https://www.cytometrie-dijon.fr/>). For each sample, a minimum of 45,000 up to 100,000 events were acquired for analysis.

**Statistical analysis.** The differences between the median values derived from the BL23 strain treated with or without MMC (Fig. 6B; Fig. S5) were analyzed with the Mann-Whitney test and *P* values lower than 0.05 were considered significant.

The Kruskal-Wallis test and the Dunn's multiple-comparison test were used to compare the BL23, DDB001, and DDB002 strains (Fig. 6A and C; Fig. 7A) and *P* values lower than 0.05 were considered significant.

A one-way ANOVA and Tukey's multiple-comparison test were used to compare qPCR (Fig. 4C; Fig. 5B; Fig. 7C; Fig. S4B; Fig. S6B) and cytometry results (Fig. S6A). *P* values lower than 0.05 were considered significant.

Error bars represent the standard deviation (SD), with \* (*P* < 0.05) indicating that *P* values are lower than 0.05.

**Data availability.** Data supporting the findings of this study are available in the paper and the supplementary information files. All other data are available from the corresponding author on request.

## SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

**FIG S1**, TIF file, 0.6 MB.

**FIG S2**, TIF file, 1.2 MB.

**FIG S3**, TIF file, 0.7 MB.

**FIG S4**, TIF file, 0.3 MB.

**FIG S5**, TIF file, 0.1 MB.

**FIG S6**, TIF file, 0.4 MB.

**TABLE S1**, XLSX file, 0.1 MB.

**TABLE S2**, DOCX file, 0.02 MB.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by the Regional Council of Bourgogne-Franche-Comté, the "Fonds Européen de Développement Régional (FEDER)," and the "Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation." The proteomic experiments were partially supported by the "Agence Nationale de la Recherche" in the framework of the ProFI project (Proteomics French Infrastructure, ANR-10-INBS-08) and GRAL, a program from the Chemistry Biology Health (CBH) Graduate School of the University of Grenoble Alpes (ANR-17-EURE-0003).

We thank Aline Bonnotte, Jeannine Lherminier, Elodie Noirot, and Laure Avoscan (Microscopy Facility); Nicolas Pernet and Serge Monier (Flow Cytometry Facility). We thank Luis Bermúdez-Humarán for kindly providing the plasmid pRV300 and Keith Hodson for proofreading the manuscript (ACCENT EUROPE).

We declare no competing interests.

## REFERENCES

1. Deatherage BL, Cookson BT. 2012. Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life. *Infect Immun* 80:1948–1957. <https://doi.org/10.1128/IAI.06014-11>.
2. Gill S, Catchpole R, Forterre P. 2019. Extracellular membrane vesicles in the three domains of life and beyond. *FEMS Microbiol Rev* 43:273–303. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy042>.
3. Brown L, Wolf JM, Prados-Rosales R, Casadevall A. 2015. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat Rev Microbiol* 13:620–630. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3480>.
4. Toyofuku M, Nomura N, Eberl L. 2019. Types and origins of bacterial membrane vesicles. *Nat Rev Microbiol* 17:13–24. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0112-2>.
5. Knox KW, Vesik M, Work E. 1966. Relation between excreted lipopolysaccharide complexes and surface structures of a lysine-limited culture of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 92:1206–1217. <https://doi.org/10.1128/jb.92.4.1206-1217.1966>.
6. Dorward DW, Garon CF. 1990. DNA is packaged within membrane-derived vesicles of Gram-negative but not Gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol* 56:1960–1962. <https://doi.org/10.1128/aem.56.6.1960-1962.1990>.
7. Pollack JH, Ntamere AS, Neuhaus FC. 1992. D-Alanyl-lipoteichoic acid in *Lactobacillus casei*: secretion of vesicles in response to benzylpenicillin. *J Gen Microbiol* 138:849–859. <https://doi.org/10.1099/00221287-138-5-849>.
8. Kim JH, Lee J, Park J, Park J, Cho YS. 2015. Gram-negative and Gram-positive bacterial extracellular vesicles. *Semin Cell Dev Biol* 40:97–104. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.02.006>.
9. Domingues S, Nielsen KM. 2017. Membrane vesicles and horizontal gene transfer in prokaryotes. *Curr Opin Microbiol* 38:16–21. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.03.012>.
10. Liu Y, Alexeeva S, Bachmann H, Martínez JAG, Yereimenko N, Abee T, Smid EJ. 2022. Chronic release of tailless phage particles from *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 88:14. <https://doi.org/10.1128/AEM.01483-21>.
11. Liu Y, Tempelaars MH, Boeren S, Alexeeva S, Smid EJ, Abee T. 2022. Extracellular vesicle formation in *Lactococcus lactis* is stimulated by prophage-encoded holin–lysin system. *Microb Biotechnol* 15:1281–1295. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13972>.
12. Toyofuku M, Cárcamo-Oyarce G, Yamamoto T, Eisenstein F, Hsiao C-C, Kurosawa M, Gademann K, Pilhofer M, Nomura N, Eberl L. 2017. Prophage-triggered membrane vesicle formation through peptidoglycan damage in *Bacillus subtilis*. *Nat Commun* 8:481. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00492-w>.
13. Devos S, Van Putte W, Vitse J, Van Driessche G, Stremersch S, Van Den Broek W, Raemdonck K, Braeckmans K, Stahlberg H, Kudryashev M, Savvides SN, Devreese B. 2017. Membrane vesicle secretion and prophage induction in multidrug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia* in response to ciprofloxacin stress: ciprofloxacin-induced membrane vesicle secretion. *Environ Microbiol* 19:3930–3937. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13793>.
14. Mandal PK, Ballerin G, Nolan LM, Petty NK, Whitchurch CB. 2021. Bacteriophage infection of *Escherichia coli* leads to the formation of membrane vesicles via both explosive cell lysis and membrane blebbing. *Microbiol* 167:e001021. <https://doi.org/10.1099/mic.0.001021>.
15. Turnbull L, Toyofuku M, Hynen AL, Kurosawa M, Pessi G, Petty NK, Osvalth SR, Cárcamo-Oyarce G, Gloag ES, Shimoni R, Omasits U, Ito S, Yap X, Monahan LG, Cavaliere R, Ahrens CH, Charles IG, Nomura N, Eberl L, Whitchurch CB. 2016. Explosive cell lysis as a mechanism for the biogenesis of bacterial membrane vesicles and biofilms. *Nat Commun* 7:11220. <https://doi.org/10.1038/ncomms11220>.
16. Andreoni F, Toyofuku M, Menzi C, Kalawong R, Mairpady Shambat S, François P, Zinkernagel AS, Eberl L. 2019. Antibiotics stimulate formation of vesicles in *Staphylococcus aureus* in both phage-dependent and -independent fashions and via different routes. *Antimicrob Agents Chemother* 63:e01439-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.01439-18>.
17. Abe K, Toyofuku M, Nomura N, Obana N. 2021. Autolysis-mediated membrane vesicle formation in *Bacillus subtilis*. *Environ Microbiol* 23:2632–2647. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15502>.
18. Wang X, Thompson CD, Weidenmaier C, Lee JC. 2018. Release of *Staphylococcus aureus* extracellular vesicles and their application as a vaccine platform. *Nat Commun* 9:1379. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03847-z>.
19. Dean SN, Rimmer MA, Turner KB, Phillips DA, Caruana JC, Hervey WJ, Leary DH, Walper SA. 2020. *Lactobacillus acidophilus* membrane vesicles as a vehicle of bacteriocin delivery. *Front Microbiol* 11:710. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00710>.
20. Nahui Palomino RA, Vanpouille C, Laghi L, Parolin C, Melikov K, Backlund P, Vitali B, Margolis L. 2019. Extracellular vesicles from symbiotic vaginal lactobacilli inhibit HIV-1 infection of human tissues. *Nat Commun* 10:5656. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13468-9>.
21. Lee B-H, Wu S-C, Shen T-L, Hsu Y-Y, Chen C-H, Hsu W-H. 2021. The applications of *Lactobacillus plantarum*-derived extracellular vesicles as a novel natural antibacterial agent for improving quality and safety in tuna fish. *Food Chem* 340:128104. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128104>.
22. Li Z, Clarke AJ, Beveridge TJ. 1998. Gram-negative bacteria produce membrane vesicles which are capable of killing other bacteria. *J Bacteriol* 180:5478–5483. <https://doi.org/10.1128/JB.180.20.5478-5483.1998>.
23. Li M, Lee K, Hsu M, Nau G, Mylonakis E, Ramratnam B. 2017. Lactobacillus-derived extracellular vesicles enhance host immune responses against vancomycin-resistant enterococci. *BMC Microbiol* 17:66. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-0977-7>.
24. Mata Forsberg M, Björkander S, Pang Y, Lundqvist L, Ndi M, Ott M, Escibá IB, Jaeger M-C, Roos S, Sverremark-Ekström E. 2019. Extracellular membrane vesicles from lactobacilli dampen IFN- $\gamma$  responses in a monocyte-dependent manner. *Sci Rep* 9:17109. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53576-6>.
25. Choi JH, Moon CM, Shin T-S, Kim EK, McDowell A, Jo M-K, Joo YH, Kim S-E, Jung H-K, Shim K-N, Jung S-A, Kim Y-K. 2020. *Lactobacillus paracasei*-derived extracellular vesicles attenuate the intestinal inflammatory response by augmenting the endoplasmic reticulum stress pathway. *Exp Mol Med* 52:423–437. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0359-3>.
26. Kim W, Lee EJ, Bae I-H, Myoung K, Kim ST, Park PJ, Lee K-H, Pham AVQ, Ko J, Oh SH, Cho E-G. 2020. *Lactobacillus plantarum*-derived extracellular vesicles induce anti-inflammatory M2 macrophage polarization in vitro. *J Extracell Vesicles* 9:1793514. <https://doi.org/10.1080/20013078.2020.1793514>.
27. Kuhn T, Koch M, Fuhrmann G. 2020. Probiomimetics—novel lactobacillus-mimicking microparticles show anti-inflammatory and barrier-protecting effects in gastrointestinal models. *Small* 16:2003158. <https://doi.org/10.1002/sml.202003158>.
28. Hu R, Lin H, Wang M, Zhao Y, Liu H, Min Y, Yang X, Gao Y, Yang M. 2021. *Lactobacillus reuteri*-derived extracellular vesicles maintain intestinal immune homeostasis against lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in broilers. *J Anim Sci Biotechnol* 12:25. <https://doi.org/10.1186/s40104-020-00532-4>.
29. Champagne-Jorgensen K, Mian MF, McVey Neufeld K-A, Stanisz AM, Bienenstock J. 2021. Membrane vesicles of *Lactobacillus rhamnosus* JB-1 contain immunomodulatory lipoteichoic acid and are endocytosed by intestinal epithelial cells. *Sci Rep* 11:13756. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93311-8>.
30. Nutrition Division. 2006. Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation. Food and Agriculture Organization of the United Nations: World Health Organization, Rome, Italy. <https://www.fao.org/publications/card/fr/c/7c102d95-2fd5-5b22-8faf-f0b2e68dfbb6/>.
31. Rofe RD. 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J Nutr* 130:3965–4025. <https://doi.org/10.1093/jn/130.2.3965>.
32. de Roos NM, Katan MB. 2000. Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. *Am J Clin Nutr* 71:405–411. <https://doi.org/10.1093/ajcn/71.2.405>.
33. Rochat T, Bermúdez-Humarán L, Gratadoux J-J, Fourage C, Hoebler C, Corthier G, Langella P. 2007. Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus casei* BL23 producing or not a manganese-dependent catalase on DSS-induced colitis in mice. *Microb Cell Fact* 6:22. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-6-22>.
34. Watterlot L, Rochat T, Sokol H, Cherbuy C, Bouloufa I, Lefèvre F, Gratadoux J-J, Honvo-Hueto E, Chilmoneczk S, Blugeon S, Corthier G, Langella P, Bermúdez-Humarán LG. 2010. Intra-gastric administration of a superoxide dismutase-producing recombinant *Lactobacillus casei* BL23 strain attenuates DSS colitis in mice. *Int J Food Microbiol* 144:35–41. <https://doi.org/10.1016/j.jifoodmicro.2010.03.037>.
35. Archambaud C, Nahori M-A, Soubigou G, Bécavin C, Laval L, Lechat P, Smokvina T, Langella P, Lecuit M, Cossart P. 2012. Impact of lactobacilli on orally acquired listeriosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:16684–16689. <https://doi.org/10.1073/pnas.1212809109>.
36. Domínguez Rubio AP, Martínez JH, Martínez Casillas DC, Coluccio Leskow F, Piuri M, Pérez OE. 2017. *Lactobacillus casei* BL23 produces microvesicles carrying proteins that have been associated with its probiotic effect. *Front Microbiol* 8:1783. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01783>.
37. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig J, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez J-Y, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9:676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.

38. Kanehisa M, Goto S. 2000. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 28:27–30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>.
39. The UniProt Consortium. 2021. UniProt: the universal protein knowledge base in 2021. *Nucleic Acids Res* 49:D480–D489. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1100>.
40. Käll L, Krogh A, Sonnhammer ELL. 2004. A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *J Mol Biol* 338:1027–1036. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.03.016>.
41. Arndt D, Grant JR, Marcu A, Sajed T, Pon A, Liang Y, Wishart DS. 2016. PFASTER: a better, faster version of the PFAST phage search tool. *Nucleic Acids Res* 44:W16–W21. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw387>.
42. Dieterle ME, Fina Martin J, Durán R, Nemirovsky SI, Sanchez Rivas C, Bowman C, Russell D, Hatfull GF, Cambillau C, Piuri M. 2016. Characterization of prophages containing “evolved” Dit/Tal modules in the genome of *Lactobacillus casei* BL23. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:9201–9215. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7727-x>.
43. Hendrix RW, Casjens SR, Lavigne R. 2012. Family - *Siphoviridae*, p 86–98. In King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (ed), *Virus taxonomy*. Elsevier, San Diego, CA, USA. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384684-6.00004-5>.
44. Dean SN, Leary DH, Sullivan CJ, Oh E, Walper SA. 2019. Isolation and characterization of *Lactobacillus*-derived membrane vesicles. *Sci Rep* 9:877. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37120-6>.
45. Bäuerl C, Coll-Marqués JM, Tarazona-González C, Pérez-Martínez G. 2020. *Lactobacillus casei* extracellular vesicles stimulate EGFR pathway likely due to the presence of proteins P40 and P75 bound to their surface. *Sci Rep* 10:19237. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75930-9>.
46. Olaya-Abril A, Prados-Rosales R, McConnell MJ, Martin-Peña R, González-Reyes JA, Jiménez-Munigua I, Gómez-Gascón L, Fernández J, Luque-García JL, García-Lidón C, Estévez H, Pachón J, Obando I, Casadevall A, Pirofski L, Rodríguez-Ortega MJ. 2014. Characterization of protective extracellular membrane-derived vesicles produced by *Streptococcus pneumoniae*. *J Proteomics* 106:46–60. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.04.023>.
47. Rivera J, Cordero RJB, Nakouzi AS, Frases S, Nicola A, Casadevall A. 2010. *Bacillus anthracis* produces membrane-derived vesicles containing biologically active toxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:19002–19007. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008843107>.
48. Tashiro Y, Ichikawa S, Shimizu M, Toyofuku M, Takaya N, Nakajima-Kambe T, Uchiyama H, Nomura N. 2010. Variation of physicochemical properties and cell association activity of membrane vesicles with growth phase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 76:3732–3739. <https://doi.org/10.1128/AEM.02794-09>.
49. Baeza N, Delgado L, Comas J, Mercade E. 2021. Phage-mediated explosive cell lysis induces the formation of a different type of O-IMV in *Shewanella vesiculosa* M7T. *Front Microbiol* 12:713669. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.713669>.
50. Pérez-Cruz C, Briánso F, Sonneleitner E, Bläsi U, Mercadé E. 2021. RNA release via membrane vesicles in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 is associated with the growth phase. *Environ Microbiol* 23:5030–5041. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15436>.
51. Schwechheimer C, Kuehn MJ. 2015. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nat Rev Microbiol* 13:605–619. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3525>.
52. Bobay L-M, Touchon M, Rocha EPC. 2014. Pervasive domestication of defective prophages by bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:12127–12132. <https://doi.org/10.1073/pnas.1405336111>.
53. Wang X, Kim Y, Ma Q, Hong SH, Pokusaeva K, Sturino JM, Wood TK. 2010. Cryptic prophages help bacteria cope with adverse environments. *Nat Commun* 1:147. <https://doi.org/10.1038/ncomms1146>.
54. Owen SV, Canals R, Wenner N, Hammarlöf DL, Kröger C, Hinton JCDY. 2020. A window into lysogeny: revealing temperate phage biology with transcriptomics. *Microb Genomics* 6:e000330. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000330>.
55. Mazé A, Boël G, Zúñiga M, Bourand A, Loux V, Yebra MJ, Monedero V, Correia K, Jacques N, Beaufils S, Poncet S, Joyet P, Milohanic E, Casarégola S, Auffray Y, Pérez-Martínez G, Gibrat J-F, Zagorec M, Francke C, Hartke A, Deutscher J. 2010. Complete genome sequence of the probiotic *Lactobacillus casei* strain BL23. *J Bacteriol* 192:2647–2648. <https://doi.org/10.1128/JB.00076-10>.
56. Baugher JL, Durmaz E, Klaenhammer TR. 2014. Spontaneously induced prophages in *Lactobacillus gasseri* contribute to horizontal gene transfer. *Appl Environ Microbiol* 80:3508–3517. <https://doi.org/10.1128/AEM.04092-13>.
57. Alexeeva S, Guerra Martínez JA, Spus M, Smid EJ. 2018. Spontaneously induced prophages are abundant in a naturally evolved bacterial starter culture and deliver competitive advantage to the host. *BMC Microbiol* 18:120. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1229-1>.
58. Nanda AM, Thormann K, Frunzke J. 2015. Impact of spontaneous prophage induction on the fitness of bacterial populations and host-microbe interactions. *J Bacteriol* 197:410–419. <https://doi.org/10.1128/JB.02230-14>.
59. Burby PE, Simmons LA. 2020. Regulation of cell division in bacteria by monitoring genome integrity and DNA replication status. *J Bacteriol* 202. <https://doi.org/10.1128/JB.00408-19>.
60. Suzuki H, Pangborn J, Kilgore WW. 1967. Filamentous cells of *Escherichia coli* formed in the presence of mitomycin. *J Bacteriol* 93:683–688. <https://doi.org/10.1128/jb.93.2.683-688.1967>.
61. Maredia R, Devineni N, Lentz P, Dallo SF, Yu J, Guentzel N, Chambers J, Arulanandam B, Haskins WE, Weitao T. 2012. Vesiculation from *Pseudomonas aeruginosa* under SOS. *ScientificWorldJournal* 2012:402919–402919. <https://doi.org/10.1100/2012/402919>.
62. Pospíšil J, Vítovská D, Kofroňová O, Muchová K, Šanderová H, Hubálek M, Šíková M, Modrák M, Benada O, Barák I, Krásný L. 2020. Bacterial nanotubes as a manifestation of cell death. *Nat Commun* 11:4963. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18800-2>.
63. Regulski K, Courtin P, Kulakauskas S, Chapot-Chartier M-P. 2013. A novel type of peptidoglycan-binding domain highly specific for amidated D-Asp cross-bridge, identified in *Lactobacillus casei* bacteriophage endolysins. *J Biol Chem* 288:20416–20426. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.446344>.
64. Christie GE, Calendar R. 1990. Interactions between satellite bacteriophage P4 and its helpers. *Annu Rev Genet* 24:465–490. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.24.120190.002341>.
65. Rezaei Javan R, Ramos-Sevillano E, Akter A, Brown J, Brueggemann AB. 2019. Prophages and satellite prophages are widespread in *Streptococcus* and may play a role in pneumococcal pathogenesis. *Nat Commun* 10:4852. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12825-y>.
66. Ciofu O, Beveridge TJ, Kadurugamuwa J, Walther-Rasmussen J, Hoiby N. 2000. Chromosomal  $\beta$ -lactamase is packaged into membrane vesicles and secreted from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 45:9–13. <https://doi.org/10.1093/jac/45.1.9>.
67. Rangama S, Lidbury IDEA, Holden JM, Borsetto C, Murphy ARJ, Hawkey PM, Wellington EMH. 2021. Mechanisms involved in the active secretion of CTX-M-15  $\beta$ -lactamase by pathogenic *Escherichia coli* ST131. *Antimicrob Agents Chemother* 65:e0066321. <https://doi.org/10.1128/AAC.00663-21>.
68. Devos S, Stremersch S, Raemdonck K, Braeckmans K, Devreese B. 2016. Intra- and interspecies effects of outer membrane vesicles from *Stenotrophomonas maltophilia* on  $\beta$ -lactam resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 60:2516–2518. <https://doi.org/10.1128/AAC.02171-15>.
69. Shockman GD, Høltje J-V. 1994. Chapter 7 Microbial peptidoglycan (murein) hydrolases, p 131–166. In Ghuysen J-M, Hakenbeck R (ed), *New Comprehensive Biochemistry*. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0167-7306\(08\)60410-X](https://doi.org/10.1016/S0167-7306(08)60410-X).
70. Regulski K, Courtin P, Meyrand M, Claes IJ, Lebeer S, Vanderleyden J, Hols P, Guillot A, Chapot-Chartier M-P. 2012. Analysis of the peptidoglycan hydrolase complement of *Lactobacillus casei* and characterization of the major  $\gamma$ -D-glutamyl-L-lysyl-endopeptidase. *PLoS One* 7:e32301. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032301>.
71. Lee J, Lee E-Y, Kim S-H, Kim D-K, Park K-S, Kim KP, Kim Y-K, Roh T-Y, Gho YS. 2013. *Staphylococcus aureus* extracellular vesicles carry biologically active  $\beta$ -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 57:2589–2595. <https://doi.org/10.1128/AAC.00522-12>.
72. Lee J, Kim S-H, Choi D-S, Lee JS, Kim D-K, Go G, Park S-M, Kim SH, Shin JH, Chang CL, Gho YS. 2015. Proteomic analysis of extracellular vesicles derived from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proteomics* 15:3331–3337. <https://doi.org/10.1002/pmic.201500037>.
73. Karthikeyan R, Gayathri P, Gunasekaran P, Jagannadham MV, Rajendhran J. 2019. Comprehensive proteomic analysis and pathogenic role of membrane vesicles of *Listeria monocytogenes* serotype 4b reveals proteins associated with virulence and their possible interaction with host. *Int J Med Microbiol* 309:199–212. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2019.03.008>.
74. Haas B, Grenier D. 2015. Isolation, characterization and biological properties of membrane vesicles produced by the swine pathogen *Streptococcus suis*. *PLoS One* 10:e0130528. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130528>.
75. Clarke AJ. 2018. The “hole” story of predatory outer-membrane vesicles. *Can J Microbiol* 64:589–599. <https://doi.org/10.1139/cjm-2017-0466>.
76. Vasilyeva NV, Tsfasman IM, Suzina NE, Stepnaya OA, Kulaev IS. 2008. Secretion of bacteriolytic endopeptidase L5 of *Lysobacter* sp. XL1 into the medium by means of outer membrane vesicles: secretion of bacteriolytic enzyme L5. *FEBS J* 275:3827–3835. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06530.x>.
77. Schöling SR, Beveridge TJ. 2006. Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms. *J Bacteriol* 188:5945–5957. <https://doi.org/10.1128/JB.00257-06>.

78. Yonezawa H, Osaki T, Kurata S, Fukuda M, Kawakami H, Ochiai K, Hanawa T, Kamiya S. 2009. Outer membrane vesicles of *Helicobacter pylori* TK1402 are involved in biofilm formation. *BMC Microbiol* 9:197. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-197>.
79. Renelli M, Matias V, Lo RY, Beveridge TJ. 2004. DNA-containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential. *Microbiology (Reading)* 150:2161–2169. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26841-0>.
80. Manning AJ, Kuehn MJ. 2011. Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. *BMC Microbiol* 11:258. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-258>.
81. Leloup L, Ehrlich SD, Zagorec M, Morel-Deville F. 1997. Single-crossover integration in the *Lactobacillus sake* chromosome and insertional inactivation of the *ptsI* and *lacL* genes. *Appl Environ Microbiol* 63:2117–2123. <https://doi.org/10.1128/aem.63.6.2117-2123.1997>.
82. Muñoz-Provencio D, Rodríguez-Díaz J, Collado MC, Langella P, Bermúdez-Humarán LG, Monedero V. 2012. Functional analysis of the *Lactobacillus casei* BL23 sortases. *Appl Environ Microbiol* 78:8684–8693. <https://doi.org/10.1128/AEM.02287-12>.
83. Posno M, Leer RJ, van Luijk N, van Giezen MJF, Heuvelmans PTHM, Lokman BC, Pouwels PH. 1991. Incompatibility of *Lactobacillus* vectors with replicons derived from small cryptic *Lactobacillus* plasmids and segregational instability of the introduced vectors. *Appl Environ Microbiol* 57:1822–1828. <https://doi.org/10.1128/aem.57.6.1822-1828.1991>.
84. Prados-Rosales R, Brown L, Casadevall A, Montalvo-Quirós S, Luque-García JL. 2014. Isolation and identification of membrane vesicle-associated proteins in Gram-positive bacteria and mycobacteria. *MethodsX* 1:124–129. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2014.08.001>.
85. Casabona MG, Vandenbrouck Y, Attree I, Couté Y. 2013. Proteomic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 inner membrane. *Proteomics* 13:2419–2423. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200565>.
86. Vallenet D, Calteau A, Dubois M, Amours P, Bazin A, Beuvin M, Burlot L, Bussell X, Fouteau S, Gautreau G, Lajus A, Langlois J, Planel R, Roche D, Rollin J, Rouy Z, Sabatet V, Médigue C. 2020. MicroScope: an integrated platform for the annotation and exploration of microbial gene functions through genomic, pangenomic and metabolic comparative analysis. *Nucleic Acids Res* 48:D579–D589. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz926>.
87. Bouyssie D, Hesse A-M, Mouton-Barbosa E, Rompais M, Macron C, Carapito C, Gonzalez de Peredo A, Couté Y, Dupieris V, Burel A, Menetrey J-P, Kalaitzakis A, Poisat J, Romdhani A, Burlet-Schiltz O, Cianféran S, Garin J, Bruley C. 2020. Proline: an efficient and user-friendly software suite for large-scale proteomics. *Bioinformatics* 36:3148–3155. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa118>.
88. Couté Y, Bruley C, Burger T. 2020. Beyond target-decoy competition: stable validation of peptide and protein identifications in mass spectrometry-based discovery proteomics. *Anal Chem* 92:14898–14906. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c00328>.
89. Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* 25:402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
90. Darling ACE, Mau B, Blattner FR, Perna NT. 2004. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Res* 14:1394–1403. <https://doi.org/10.1101/gr.2289704>.

## Supplemental Material

### Supplementary 1

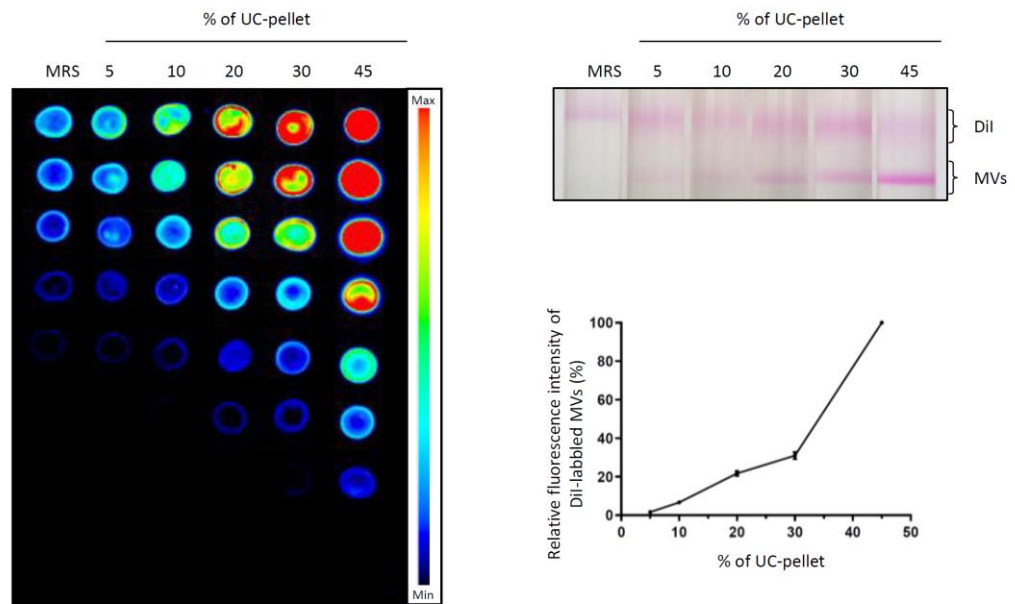


FIG S1 Validation of the relative quantification method of purified and DiI labeled MVs. After the first UC, several dilutions of the suspended pellet were prepared (q.s. 1 mL of PBS). The diluted solutions were then labeled with DiI 30 min at 37°C and loaded on top of the density gradient before the last UC, as described in the diagram (Fig. 2A). The fractions containing the DiI-labeled MVs were then carefully collected and used to prepare a serial dilution series. 5  $\mu$ L of each dilution was then dropped into a nitrocellulose membrane (0.2  $\mu$ m), dried at room temperature, incubated for 5 min in Tris-buffered saline (1X) and quantified using the Odyssey Fc imager (LI-COR).

### Supplementary 2

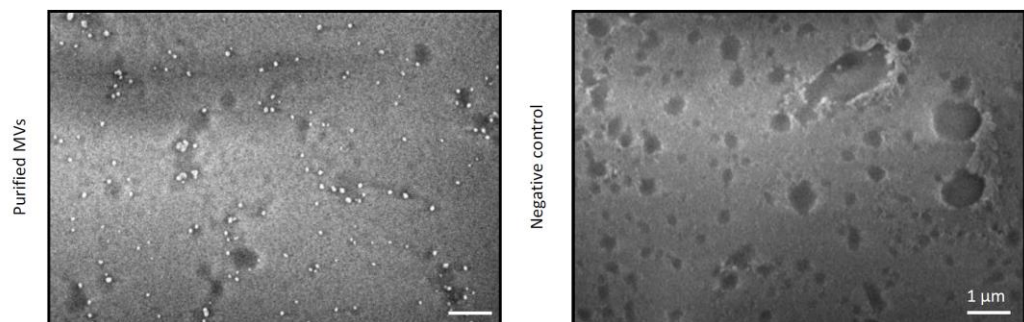
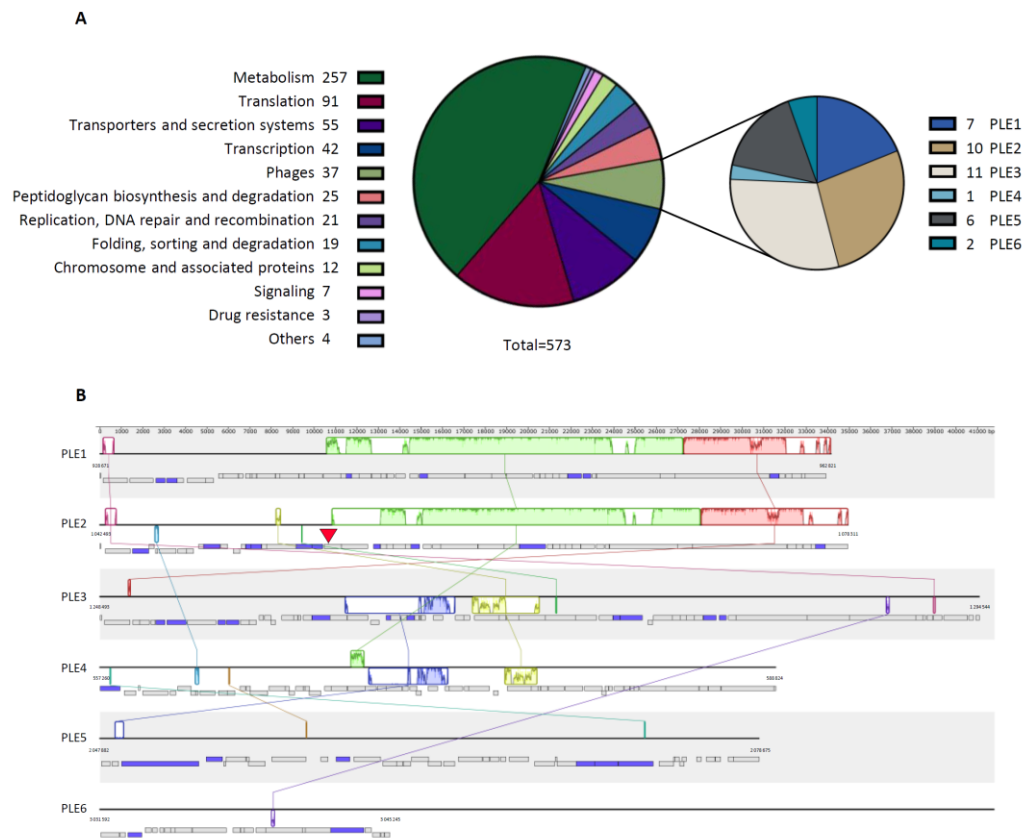


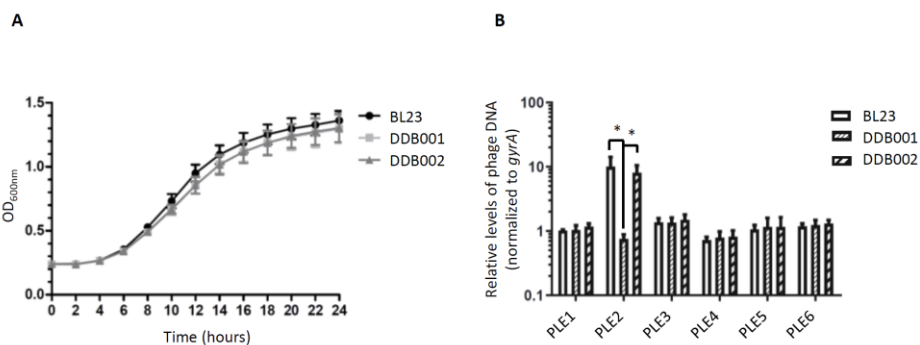
FIG S2 Cryo-SEM image of purified MVs. The image on the right (negative control) shows that no MVs were observed after the purification protocol was performed on the culture medium.

Supplementary 3



**FIG S3** Proteins from 6 putative prophages were identified in the MV fraction of *L. casei* BL23 by MS-based proteomics. (A) Pie chart showing the proportion of protein encoded by each predicted prophage sequences. (B) Alignment of the 6 predicted prophage sequences using the ProgressiveMauve software (1). The colored collinear blocks represent homologous DNA regions internally free from genomic rearrangements. The similarity profile contained in these collinear blocks indicates the average level of conservation between the corresponding DNA regions. The prophage genes are shown below each comparison as black outlined boxes on the plus (above horizontal line) and minus (below horizontal line) strands. Blue boxes represent the proteins detected by proteomics in the MV fraction of *L. casei* BL23. The position of the integrated plasmid (pRV300) in the genome of the strain DDB001 is also indicated by a red triangle (genomic location: from 1 058 180 to 1 058 180 bp). Please note that pRV300 was inserted in the gene *lcaB\_10980* (putative DNA primase) of the prophage PLE2.

Supplementary 4



**FIG S4** The mutation in the prophage PLE2 neither affect the growth of the bacteria nor the replication of other putative prophages. (A) Growth curve showing the OD600nm of the parental, DDB001 and DDB002 strains during the first 24 hours of culture. (B) The replication of each putative prophage in the parental strain BL23, and in the DDB001 and DDB002 strains was quantified by qPCR as per strategy 1 presented in Figure 4B.

Supplementary 5

A

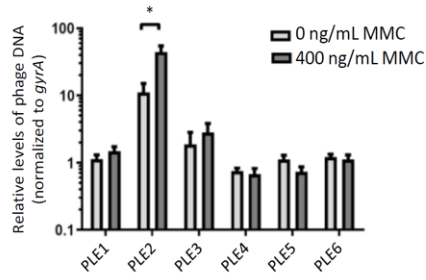
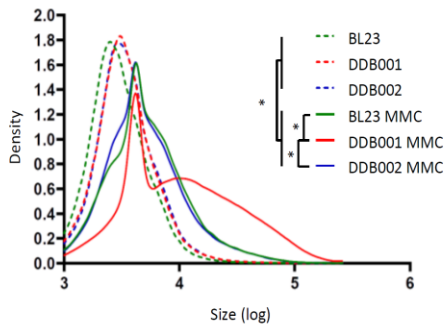


FIG S5 Treatment with MMC affects the replication of PLE2. The effect of the MMC treatment on the replication of each putative prophage in the parental strain BL23 was quantified by qPCR, using strategy 1 presented in Figure 4B.

Supplementary 6

A



B

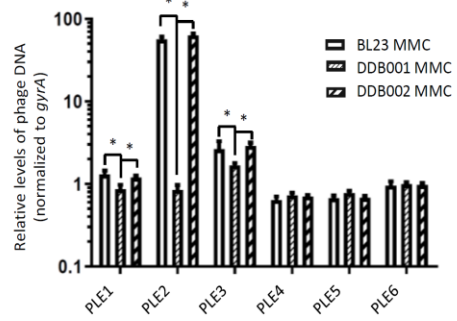


FIG S6 Impact of the PLE2 mutation on bacterial morphology after MMC treatment and on the replication of other putative prophages. (A) The size distribution of BL23, DDB001 and DDB002 strains treated with or without MMC (400 ng/mL) were obtained by cytometry. (B) The effect of MMC treatment on the replication of each putative prophage was compared by qPCR in BL23, DDB001 and DDB002 strains, using strategy 1 presented in Figure 4B.

## 2. Travaux complémentaires

### 2.1 Etude de l'excision et de la réplication du phage PLE2

#### 2.1.1 Introduction : contexte et objectifs

Dans le cadre des travaux publiés dans l'article 1 (da Silva Barreira *et al.*, 2022), il a été observé que l'intégration du plasmide non répliquatif pRV300 dans le gène *lcabl\_rs05400* empêche l'excision et la réplication du prophage PLE2 en absence et en présence de stress génotoxiques. Cet effet est à la fois le résultat de l'interruption du gène *lcabl\_rs05400* ainsi que de l'arrêt précoce de la transcription par les terminateurs du plasmide pRV300. Il est important de noter que l'ensemble des gènes transcrits sur le même ARNm et présents en aval du gène *lcabl\_rs05400* sont également affectés par la présence de pRV300. En raison de ce phénomène appelé effet polaire, les résultats de l'article ne permettent pas d'établir de lien clair entre la réplication du phage PLE2 et l'activité de la protéine LCABL\_RS05400 (DNA primase putative). C'est pourquoi, dans cette partie du travail, nous avons souhaité éclaircir la contribution de la protéine LCABL\_RS05400 sur l'excision et la réplication du phage PLE2.

#### 2.1.2 Matériels et méthodes

##### Souches bactériennes et conditions de croissance

Les souches bactériennes et les plasmides utilisés dans cette partie sont présentés dans le tableau 9A-B (Souches ; Plasmides). Sauf indication contraire, les souches de *L. casei* sont cultivées en anaérobiose dans un milieu Man-Rogosa-Sharpe (MRS ; Conda) à 37 °C sans agitation pendant 24 h. Les souches mutantes de *L. casei* (Tableau 9A ; Souches) sont sélectionnées en MRS solide (1,5 % d'agar) et sont maintenues en MRS liquide supplémenté avec 5 µg/mL d'érythromycine.

Les bactéries *Escherichia coli* DH5a sont cultivées dans un milieu LB (Luria broth) à 37 °C sous agitation et ont été utilisées comme hôte pour le clonage. Les souches *Escherichia coli* DH5α transformantes ont été sélectionnées sur milieu LB solide (1,5 % d'agar) avec 100 µg/mL d'ampicilline.

##### Construction des plasmides et des souches mutantes

La construction des mutants d'insertion de *L. casei* BL23 est adaptée de la stratégie de mutagène publiée par Leloup *et al.* (1997) et Muñoz-Provencio *et al.* (2012). Les souches mutantes DDB003, DDB004 et DDB005 sont obtenues par insertion de plasmides (pRV003, pRV004, pRV005) comme expliqué dans l'article da Silva Barreira *et al.* (2022). Les amorces et le détail de la construction des plasmides sont présentés dans le Tableau 9B-C (Plasmides ; Oligonucléotides-Construction des plasmides).

##### qPCR (Stratégie 1)

La réplication du phage PLE2 dans les souches de *L. casei* BL23, est analysée par qPCR selon la stratégie 1 comme présenté Figure 4B dans l'article da Silva Barreira *et al.* (2022).

Brièvement, l'ADN des souches de *L. casei* BL23 est préparé à l'aide du kit InstaGene Matrix (Bio-Rad). Ensuite, les ADN sont ajoutés à une solution commerciale iTaq Universal SYBR green (Bio-Rad) et la qPCR est réalisée avec un thermocycleur (CFX96, Bio-Rad) en suivant les instructions du fabricant. Les amorces utilisées pour comparer la réplication du phage PLE2 sont listées dans le Tableau 9C (Oligonucléotides-Amorces qPCR). Deux répétitions techniques et trois répétitions biologiques sont réalisées par échantillon. La méthode utilisée pour calculer la quantité relative d'ADN est présentée dans l'article de da Silva Barreira *et al.* (2022).



### Extraction des ARNm et RT-PCR

Les ARNm des souches de *L. casei* BL23 sont préparés à l'aide du kit Direct-zol RNA MiniPrep (Zymo Research) en suivant les instructions du fabricant. Les ARNm sont ensuite traités à la DNase I (Roche) afin d'éliminer l'ADN génomique. L'absence de contamination des ARNm par de l'ADN génomique est vérifiée sur gel d'agarose (Fig. 37 ; condition ARNm). Les ARNm sont ensuite retro-transcrits en ADN complémentaires (ADNc) à l'aide du kits cDNA Reverse Transcription (Thermo Fisher Scientific) conformément aux instructions du fabricant. Enfin, une PCR est réalisée à l'aide du kit GoTaq DNA Polymerase (Promega) selon les recommandations du fournisseur. Les amorces utilisées pour l'amplification sont listées dans le Tableau 9C (Oligonucléotides-Amorces RT-PCR).

**Tableau 9 Souches (A), plasmides (B) et oligonucléotides (C) utilisés dans cette étude.**

(A)

Souches	Caractéristiques	Résistance(s)	Source ou référence
<i>Escherichia coli</i>			
DH5 $\alpha$	F- $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA_argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) phoA supE44 thi_1 gyrA96 relA1 $\lambda$ <sup>-</sup>		(Anton and Raleigh, 2016)
<i>Lactocaseibacillus casei</i>			
BL23	Souches de laboratoire ; génome séquencé		(Mazé <i>et al.</i> , 2010)
DDB001	BL23 ( <i>lcabl_rs05400</i> ::pRV300)	Ery <sup>r</sup>	(da Silva Barreira David <i>et al.</i> , 2022)
DDB002	BL23 contenant pRV002 inséré dans le génome à la position 2,441,492	Ery <sup>r</sup>	(da Silva Barreira David <i>et al.</i> , 2022)
DDB010	BL23 ( <i>lcabl_rs05405</i> ::pRV300)	Ery <sup>r</sup>	Cette étude
DDB011	BL23 ( <i>lcabl_rs05425</i> ::pRV300)	Ery <sup>r</sup>	Cette étude
DDB012	BL23 ( <i>lcabl_rs05450</i> ::pRV300)	Ery <sup>r</sup>	Cette étude

(B)

Plasmides	Caractéristiques	Résistance(s)	Source ou référence
pRV300	Plasmide d'insertion de lactobacilles	Amp <sup>r</sup> , Ery <sup>r</sup>	(Leloup <i>et al.</i> , 1997)
pRV001	pRV300 contenant un fragment de 435 bp du gène <i>lcabl_rs05400</i> , cloné au site EcoRI	Ery <sup>r</sup>	(da Silva Barreira David <i>et al.</i> , 2022)
pRV002	pRV300 contenant un fragment de 442 pb d'une région intergénique (comprise entre les gènes <i>lcabl_rs12110</i> et <i>lcabl_rs12115</i> ), cloné aux sites HindIII/SacI	Ery <sup>r</sup>	(da Silva Barreira David <i>et al.</i> , 2022)
pRV010	pRV300 contenant un fragment de 508 bp du gène <i>lcabl_rs05405</i> , cloné aux sites EcoRI/SacI	Ery <sup>r</sup>	Cette étude
pRV011	pRV300 contenant un fragment de 406 bp du gène <i>lcabl_rs05425</i> , cloné aux sites HindIII/SacI	Ery <sup>r</sup>	Cette étude
pRV012	pRV300 contenant un fragment de 783 bp du gène <i>lcabl_rs05450</i> , cloné au site EcoRI	Ery <sup>r</sup>	Cette étude

Ery<sup>r</sup>, érythromycine résistante ; Amp<sup>r</sup>, ampicilline résistante.

(C)

Oligonucleotides	Séquence (5' _3')
Construction des plasmides pRV001, pRV002, pRV003, pRV004, pRV005	
<i>P001_FD</i>	ACTAATGAATTCGGCTTCTATGTGTTACCAATGC
<i>P001_RV</i>	CCTAAGGAATTCTAATCCATCACTGGCTTCAAC
<i>P002_FD</i>	GCACACAAGCTTTGCCAACTCCGCAATCTCC
<i>P002_RV</i>	AGTCTTGAGCTCTTTTACGCTCTATGACACGCAC
<i>P010_FD</i>	CGACACGAATTCOAAGGCAATCCAAGTCTTCAC
<i>P010_RV</i>	GCTTATGAGCTCGCTGCTGTTGTTACTCGCTGTC
<i>P011_FD</i>	ACTCTGAAGCTTGGTCACACGGCGGCAGAAATAG
<i>P011_RV</i>	GATCTTGAGCTCTCTGCGTCTGTGACGAGTG
<i>P012_FD</i>	GCATCAGAATTCCTCAATACTGGCAATCGTTTGTG
<i>P012_RV</i>	GGTCTTGAATTCGTTTCATCCCTGTAACCTTCGG
Amorces qPCR	
Comparaison de la réplication du phage PLE2	
<i>PLE2_FD</i>	CAACCGATCAACCTGCTACACC
<i>PLE2_RV</i>	GATTATCCATGCCTGCCGCTCC
Amorces RT-PCR	
Étude de l'opéron du phage PLE2 portant le gène <i>lcabl_rs05400</i>	
<i>PCR_1-F</i>	GGCGAGCATTACCGATTG
<i>PCR_1-R</i>	TGACTCAAGCGTGTCTGTC
<i>PCR_2-F</i>	ATGGACGATTTGGGTTTCAAGAAG
<i>PCR_2-R</i>	ACTGCTGGCGGTTCAAGTTTATC
<i>PCR_3-F</i>	ACACTTGCCAGGAGAATCAG
<i>PCR_3-R</i>	CTGAATGGATGGTGTGTTGTTG
<i>PCR_4-F</i>	CCAGACGAAACGAGTTGGTG
<i>PCR_4-R</i>	ATCGTAGCCGCCATCAGTG
<i>PCR_5-F</i>	CACGCTCAAAGATGCCGAC
<i>PCR_5-R</i>	CCAGAACCGCTTGATTTTCATCAG
<i>PCR_6-F</i>	GATACCAGCCAGAAGCATTGAG
<i>PCR_6-R</i>	GTGAAGACTTGGGATTGCCTTG
<i>PCR_7-F</i>	GTTGGGTGTTGATGACTTAGTCG
<i>PCR_7-R</i>	GCTATTGGTGCGAATGATTGTGC
<i>PCR_8-F</i>	GACCTAACAGGATTTCCGGCAC
<i>PCR_8-R</i>	GGCATTGTTGGATCAGCGGAC
<i>PCR_9-F</i>	AATGATGACACGCTAGAGGGTG
<i>PCR_9-R</i>	AGCAGCATAGACATGGTGTGC

FD, forward; RV, reverse

### 2.1.3 Résultats – Discussion

Selon les prédictions de Dieterle *et al.* (2016), les gènes *lcabl\_rs05400* et *lcabl\_rs05405* font partie du module de réplication du prophage PLE2 et codent des protéines putatives aux activités ADN primase et ADN hélicase respectivement (Fig. 35).

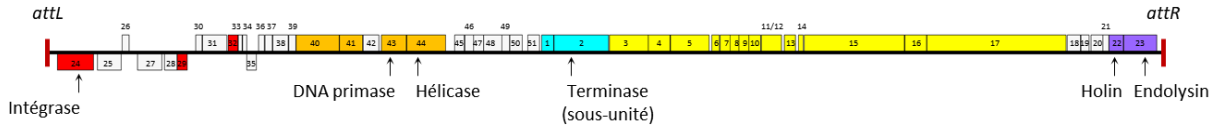


Fig. 35 Carte génétique du prophage PLE2. L'ensemble des gènes putatifs du prophage PLE2 sont représentés par des boîtes au-dessus ou au-dessous du génome, selon qu'ils sont transcrits vers la droite ou vers la gauche, respectivement. Selon les fonctions putatives qu'ils exercent, les gènes sont regroupés dans des modules indiqués par différentes couleurs : fonction d'empaquetage (bleu clair), structure du virion (jaune), lyse (violet), intégration/immunité (rouge) et réplication (orange). Les gènes aux fonctions inconnues sont colorés en blanc. Adaptée de Dieterle *et al.*, 2016.

Les ADN primases et les ADN hélicases sont des enzymes nécessaires à l'initiation et la synthèse de l'ADN au cours de la réplication (Fig. 36A-B). En effet, les ADN primases sont des ARN polymérases qui synthétisent de courts fragments d'ARN permettant l'amorçage de la synthèse d'ADN par les ADN polymérases bactériennes (Fig. 36A-B). Les ADN primases sont particulièrement importantes pour la synthèse des brins d'ADN retardés qui s'effectue sous forme d'une série de fragments discrets, appelés fragments d'Okazaki (Fig. 36B). Les hélicases répliquatives permettent quant à elles de séparer les 2 brins d'ADN en amont de la fourche de réplication au cours de la synthèse de l'ADN (Fig. 36B). Notons que les ADN primases et les ADN hélicases s'assemblent également au niveau de l'origine de réplication bactérienne pour former le primosome, ce qui permet notamment la synthèse d'amorces nécessaire à l'initiation de la réplication (Fig. 36A) (Robinson and van Oijen, 2013).

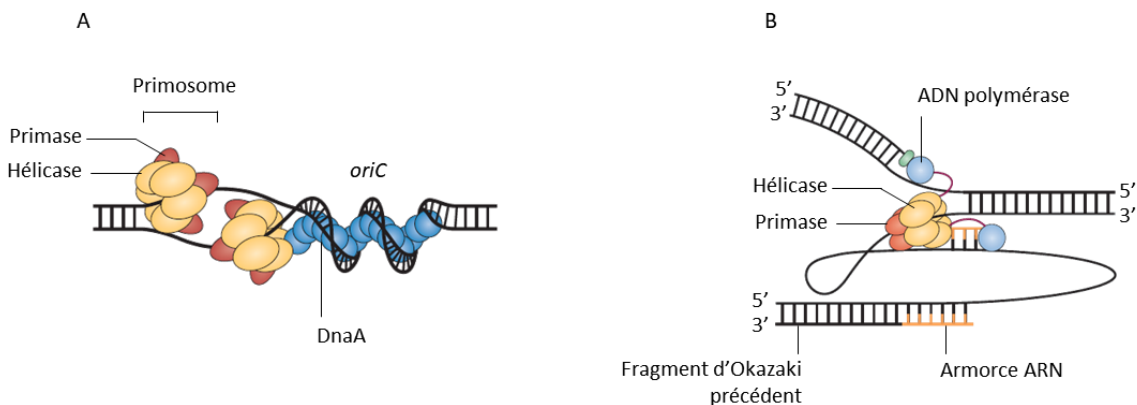


Fig. 36 Illustration du rôle joué par les ADN primases et les ADN hélicases lors de l'initiation et de la synthèse de l'ADN au cours de la réplication. (A) Schéma illustrant une des étapes de l'initiation de la réplication de l'ADN chez *Escherichia coli*. Les protéines DnaA se lient de manière coopérative au niveau de l'origine de réplication (*oriC*) et entraînent ainsi l'ouverture des hélices de l'ADN. L'hélicase (DnaB) suivie de la primase (DnaG) se chargent sur les ADN simples brins, puis l'ADN polymérase III holoenzyme se forme. La réplication démarre ensuite au niveau des amorces ARN synthétisées par les primases. (B) Modèle simplifié de la fourche de réplication du bactériophage T7 au cours de la réplication. Adaptées de Andrew Robinson et Antoine M. van Oijen 2013.

La proximité des gènes *lcabl\_rs05400* et *lcabl\_rs05405* sur le génome de PLE2 et le rôle putatif des protéines codées par ces gènes dans la réplication suggèrent qu'ils font partie d'une même unité de régulation transcriptionnelle. Afin de vérifier cette hypothèse, les limites de l'opéron contenant ces deux gènes ont été identifiées par RT-PCR en suivant la stratégie détaillée dans la figure 37. L'opéron du mutant DDB001 (obtenu par intégration du plasmide pRV300 dans le gène *lcabl\_rs05400*) et de la souche parentale *L. casei* BL23 ont ainsi été analysés (Fig. 37).

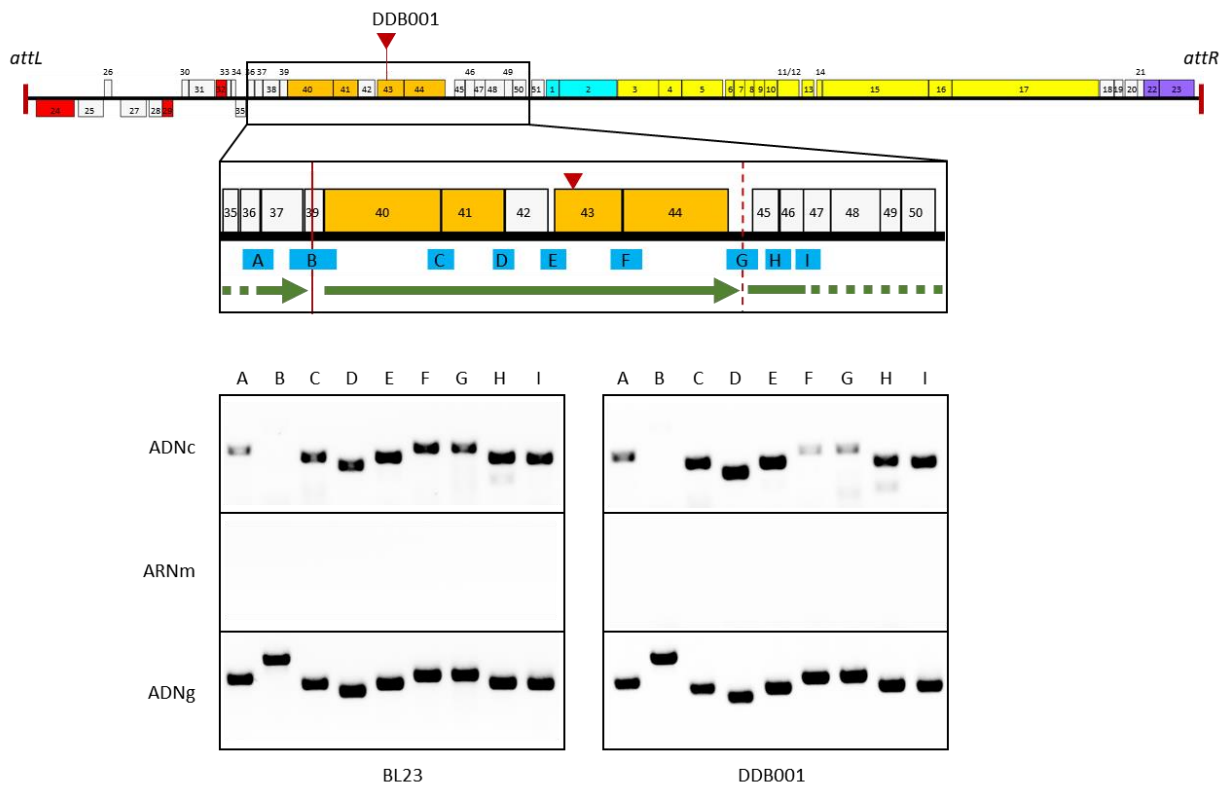


Fig. 37 Identification par RT-PCR des limites de l'opéron contenant le gène codant pour la DNA primase (LCABL\_RS05400). Le schéma illustre la stratégie adoptée pour déterminer l'unité de transcription portant les gènes codant pour la DNA primase chez la souche DDB001 et la souche parentale BL23. Tout d'abord, les ARN messagers (ARNm) des bactéries ont été extraits après 24 h de croissance en condition standard. Ensuite, les ARNm ont été rétrotranscrits en ADN complémentaires (ADNc). Puis, les régions représentées par les boîtes bleues numérotées de 1 à 9, ont été amplifiées par PCR en utilisant les ADNc obtenus. Enfin, les produits d'amplification ont été marqués au BET et séparés sur gel d'agarose 1 % avant d'être observés au UVs. Les conditions « ARNm » et « ADNg » correspondent respectivement aux résultats de l'amplification par PCR des ARNm utilisés pour la rétrotranscription (contrôle négatif) et de l'ADN génomique (contrôle positif) des deux souches (BL23, DDB001). Les flèches vertes indiquent le sens et la taille des unités de transcription. La position de l'insertion du plasmide pRV300 dans la souche DDB001 est signifiée par un triangle rouge au-dessus du gène muté correspondant.

On observe figure 37 que la région B n'a pas été amplifiée à partir des ADNc extraits des souches DDB001 et BL23 contrairement aux régions A et C. Ces résultats suggèrent donc qu'un terminateur et un promoteur de transcription sont présents successivement dans la région B. De plus, une diminution de l'intensité des bandes amplifiées est observée dans les régions F et G de la souche DDB001 contrairement aux résultats de la souche parentale BL23. Cette observation permet de dire que l'insertion du plasmide pRV300 dans le gène DDB001 entraîne un arrêt partiel de la transcription du gène *lcabl\_rs05400* et du gène *lcabl\_rs05405* (gènes 43 et 44 respectivement) par effet polaire. De plus, la transcription d'un autre ARN est initiée en aval de la région G dans la souche DDB001 et BL23. L'arrêt partiel de la transcription suggère que le plasmide pRV300 possède un terminateur de force modérée qui permet la poursuite de la transcription avec une faible fréquence.

Dans la souche BL23, une légère diminution de l'intensité de la région G est observée, ce qui pourrait être expliqué par la présence d'un terminateur faible dans cette région. Cela signifie ainsi que la souche BL23 présente 2 types d'ARN polycistroniques. Des ARN messenger contenant les gènes compris entre la région B et la région G ainsi que des ARN plus grands s'interrompant en aval de la région G. L'ensemble des résultats de la figure 37 montrent ainsi que le gène *lcabl\_rs05400* et le gène *lcabl\_rs05405* sont présents dans une même unité transcriptionnelle qui s'achève par le gène *lcabl\_rs05405*. C'est pourquoi il est possible de dire que l'insertion du plasmide pRV300 impacte la transcription du gène *lcabl\_rs05400* ainsi que celle du gène *lcabl\_rs05405* par effet polaire.

Afin d'éclaircir le rôle de la primase (LCABL\_RS05400) et de l'hélicase (LCABL\_RS05405) sur la réplication et l'excision du phage PLE2, plusieurs mutants d'insertion appelés DDB010, DDB011 et DDB012 ont été obtenus en plus du mutant DDB001 par intégration du plasmide pRV300 selon le protocole décrit dans da Silva Barreira *et al.* (2022). La position des insertions de pRV300 est indiquée dans la figure 38A. Notons que la souche témoin nommée DDB002 a été obtenue par l'insertion du plasmide pRV300 dans une région intergénique de *L. casei* BL23 (cf. Tableau 9).

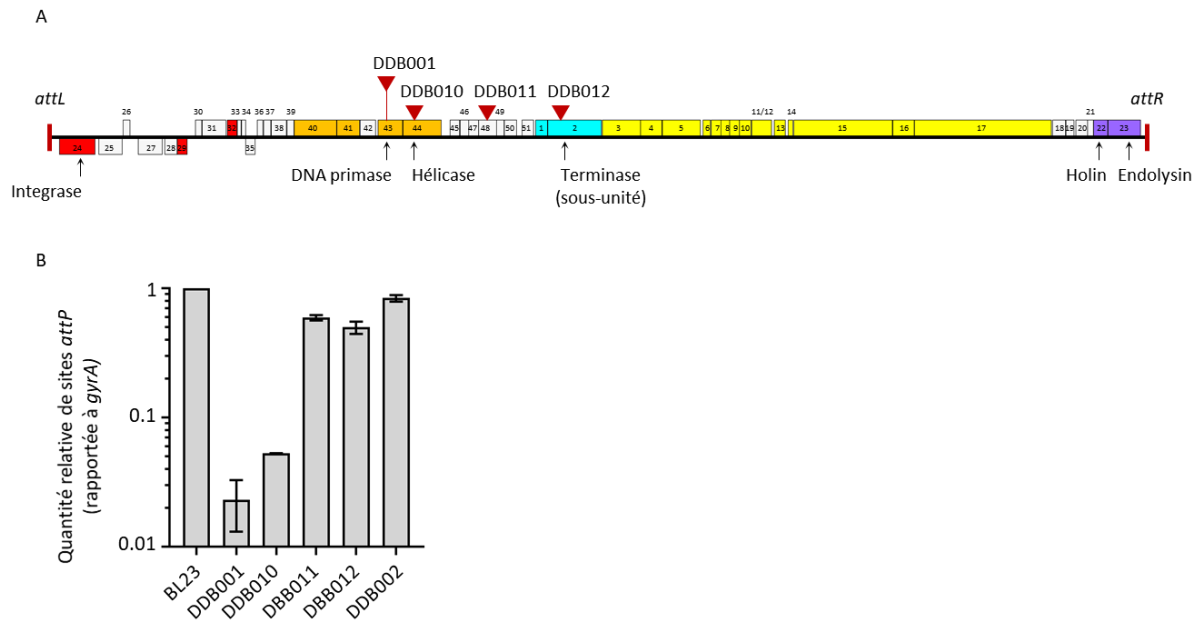


Fig. 38 Effet de la mutation de plusieurs gènes de PLE2 sur sa réplication dans *L. casei* BL23. (A) Carte génétique du prophage PLE2 et positions de l'insertion du plasmide pRV300 dans les souches mutantes DDB001, DDB010, DDB011 et DDB012. La position des insertions présentes dans les différentes souches mutantes est signifiée par un triangle rouge au-dessus des gènes mutés correspondants. Adaptée de Dieterle *et al.*, 2016. (B) Comparaison de la réplication du phage PLE2 dans les souches mutantes DDB001, DDB010, DDB011 et DDB012 en utilisant la stratégie 1 présentée dans l'article de Silva Barreira *et al.* (2022). La souche DDB002 correspond à une souche contrôle possédant le plasmide pRV300 inséré dans une région intergénique en dehors du prophage PLE2.

On constate figure 38B que l'insertion du plasmide pRV300 dans les gènes codant l'ADN primase (souche DDB001) et l'ADN hélicase (souche DDB010) entraîne une forte réduction de la réplication du phage PLE2 en comparaison à la souche parentale BL23 et à la souche contrôle DDB002. De plus, le phage PLE2 se réplique environ 2 fois plus dans la souche DDB010 que dans la souche DDB001. Par ailleurs, la présence du plasmide pRV300 dans les souches DDB002, DDB011 et DDB012 entraîne une légère réduction de la réplication du phage PLE2 en comparaison à la souche parentale BL23. Ces résultats confirment le rôle de la DNA primase (LCABL\_RS05400) dans la réplication et/ou l'excision du phage PLE2 et démontrent également un rôle de l'ADN hélicase (LCABL\_RS05405). Dans l'article de Silva Barreira *et al.* (2022), la Fig. 5A montre que le phage PLE2 ne s'excise plus dans la souche DDB001. Ainsi, la réplication 2 fois plus importante de PLE2 dans DDB010 en comparaison à DDB001 suggère que dans DDB001, l'effet de la mutation sur l'excision de PLE2 implique principalement l'ADN primase (LCABL\_RS05400). Pour confirmer le rôle de l'ADN primase dans l'excision de PLE2, il serait intéressant de comparer la quantité de sites *attB* entre les 2 souches. Si ces hypothèses sont bonnes, il serait également intéressant de tenter de curer la souche DDB010 du prophage PLE2. De plus, la co-régulation de l'ADN primase et de l'ADN hélicase dans un même opéron ainsi que l'effet synergique de la mutation des gènes codant pour ces deux protéines sur la réplication de PLE2 suggèrent que ces deux protéines ont une activité complémentaire dans la réplication et/ou l'excision du phage. Ce résultat est cohérent avec le fait que ces deux protéines sont connues pour interagir l'une avec l'autre lors de la réplication chez d'autres bactéries (Robinson and van Oijen, 2013). C'est pourquoi on ne peut

donc pas exclure l'hypothèse que l'hélicase ait également un rôle sur l'excision qui soit médié par son interaction avec l'ADN primase.

Enfin, il faut préciser que les résultats présentés ne permettent pas de déterminer si la réduction de la réplication de PLE2 dans la souche DDB001 est due à la contribution de l'ADN primase dans la réplication ou dans l'excision de PLE2. En effet, l'excision précédant la réplication, si la mutation de l'ADN primase entraîne l'arrêt de l'excision, alors il n'y a pas de réplication. Toutefois, il est raisonnable de penser que le gène *lcabl\_rs05400* possède effectivement une activité d'ADN primase en raison des prédictions réalisées par Dierterle *et al.* (2016) qui se basent sur des homologies de séquences.

#### **2.1.4 Conclusions – perspectives**

Dans l'ensemble, ces résultats ont permis de démontrer l'implication des gènes *lcabl\_rs05400* et *lcabl\_rs05405* dans la réplication du prophage PLE2, confirmant ainsi les prédictions leur attribuant un rôle d'ADN primase et d'ADN hélicase respectivement. De plus, il a été observé que la mutation du gène codant pour l'ADN hélicase est suffisante pour réduire fortement la réplication de PLE2. Nos résultats suggèrent également que l'ADN primase est impliquée dans l'excision du prophage PLE2. Dans ce contexte, il serait intéressant de déterminer si l'ADN primase interagit avec le complexe d'excision Int-Xis de PLE2 (cf. Fig.11). La présence de l'ADN primase (et éventuellement de l'ADN hélicase) au niveau du site d'excision pourrait ainsi favoriser une réplication rapide du phage dès sa sortie du chromosome bactérien. Enfin, il reste de nombreuses questions concernant l'interaction du prophage PLE2 avec les autres prophages de *L. casei* BL23. En particulier, il serait intéressant de comprendre pourquoi la mutation de l'ADN primase (LCABL\_RS05400) altère également la capacité la réplication de PLE1 et de PLE3.

## **2.2 Développement d'outils de caractérisation des MVs**

### **2.2.1 Introduction : contexte et objectifs**

Comme expliqué dans le chapitre 2 de l'introduction bibliographique, l'étude des vésicules membranaires présente de nombreux défis en raison du nombre limité d'outils d'analyse à disposition. En particulier, les anticorps sont des outils biologiques versatiles qui offrent de multiples possibilités d'analyse. Les anticorps peuvent notamment être utilisés pour réaliser des immunomarquages (ex. immunogold, immunofluorescence) qui sont des méthodes permettant de détecter de manière sensible et spécifique des antigènes associés aux vésicules. De plus, ils peuvent également être utilisés pour purifier les vésicules par immunocapture. Cette méthode de purification repose sur l'interaction spécifique des anticorps avec des antigènes présents à la surface des vésicules ce qui permet ainsi de les séparer efficacement des particules non vésiculaires présentes en solution (Coumans *et al.*, 2017). Toutefois, peu ou pas d'anticorps sont disponibles pour l'étude de souches bactériennes non modèles telles que *L. casei* BL23. C'est pourquoi dans le cadre de ma thèse, nous avons souhaité développer des anticorps dirigés contre des protéines présentes dans les vésicules libérées par *L. casei* BL23. Pour ce faire, une protéine transmembranaire et une protéine soluble ont été choisies sur la base des résultats de l'analyse protéomique des fractions vésiculaires de *L. casei* BL23 (Domínguez Rubio *et al.*, 2017; da Silva Barreira David *et al.*, 2022). Ces protéines ont ensuite été exprimées de manière recombinante dans *Escherichia coli*, purifiées et utilisées pour immuniser des lapins. Enfin, dans ce travail, nous avons évalué la spécificité des anticorps par immunoempreinte sur des lysats de souches mutantes de *L. casei* BL23 et des souches recombinantes d'*Escherichia coli*.

## 2.2.2 Matériels et méthodes

### Souches bactériennes et conditions de croissance

Les souches bactériennes et les plasmides utilisés dans cette partie sont présentés dans le Tableau 10A-B (Souches ; Plasmides). Sauf indication contraire, les conditions de culture des souches de *L. casei* et de *Escherichia coli* DH5a sont identiques à celles présentées dans la partie « II.1.2 Matériels et méthodes » de ce chapitre.

La souche *Escherichia coli* BL21 (DE3) a été utilisée pour l'expression des protéines recombinantes de *L. casei* BL23. Les bactéries *Escherichia coli* BL21 (DE3) sont cultivées dans un milieu LB liquide à 37 °C sous agitation. Les bactéries *Escherichia coli* BL21 (DE3) transformées avec les plasmides recombinants sont sélectionnées en milieu LB solide (1,5 % d'agar) avec 50 µg/mL de kanamycine.

### Construction des plasmides, des souches mutantes

La construction des mutants d'insertion de *L. casei* BL23 est adaptée de la stratégie de mutagène publiée par Leloup *et al.* (1997) et Muñoz-Provencio *et al.* (2012). Les souches mutantes DDB007 et DDB002 sont obtenues par insertion de plasmides (pRV007, pRV002) comme expliqué dans l'article de Silva Barreira *et al.* (2022).

Les gènes *lcabl\_rs00820* et *lcabl\_rs11800* sont amplifiés par PCR (Q5 High-Fidelity DNA polymerase NEB) en utilisant le génome de *L. casei* BL23 comme matrice. Les fragments amplifiés sont ensuite clonés dans le vecteur d'expression pET28a au niveau des sites de restriction NdeI/EcoRI. Les plasmides recombinants pET-28a-YhgE et pET-28a-GroEL contiennent ainsi les gènes codant pour les protéines YhgE (LCABL\_RS00820) et GroEL (LCABL\_RS11800) de *L. casei* BL23 en phase avec un tag histidine et sont sous le contrôle du promoteur inductible T7. Les plasmides sont ensuite transformés dans *Escherichia coli* BL21 (DE3) en suivant les instructions du fournisseur (Invitrogen ; réf. C6010-03). Les bactéries transformantes appelées BL21 (DE3) \_YhgE et BL21 (DE3) \_GroEL, sont sélectionnées en milieu LB supplémenté avec 50 µg/mL de kanamycine. L'intégration correct des gènes dans les plasmides est validée par séquençage.

Les amorces et le détail de la construction des plasmides sont présentés dans le tableau 10B-C (Plasmides ; Oligonucléotides-Construction des plasmides).

### Expression de protéines recombinantes, purification et production d'anticorps

Les protéines YhgE et GroEL portant un tag histidine sont purifiées à partir des bactéries BL21 (DE3) \_YhgE et BL21 (DE3) \_GroEL (Tableau 10A). Pour la purification des protéines, les bactéries recombinantes sont tout d'abord inoculées dans 500 ml de LB liquide avec 30 µg/ml de kanamycine et sont incubées à 37 °C sous agitation jusqu'à ce que la densité optique atteigne 600 nm. Ensuite, l'expression des protéines recombinantes est induite en ajoutant 1mM d'IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) pendant 3 h à 37 °C sous agitation. Les cellules sont ensuite culottées par centrifugation (4000 rpm, 4 °C, pendant 10 min), lavées avec de l'eau physiologique à 4 °C, et remises en suspension dans du tampon de lyse (Guanidinium Lysis Buffer; K950-01). Les protéines sont purifiées en conditions dénaturantes avec le kit Ni-NTA Purification System (NOVEX ; K950-01) suivant les instructions du fournisseur.

Enfin, l'immunisation de lapins est réalisée dans le cadre d'une prestation avec l'entreprise Eurogentec et a permis d'obtenir des sérums contenant des anticorps polyclonaux dirigés contre les protéines recombinantes YhgE et GroEL.



## Vérification de la spécificité des sérums de lapin par électrophorèse SDS-PAGE et immunoempreinte (Western Blot)

Tout d'abord, 10 µg d'extraits protéiques sont séparés par électrophorèse SDS-PAGE (électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium) puis électrotransférés sur une membrane en PVDF (Polyfluorure de vinylidène) (Bio-Rad) avec un système TransBlot Turbo (Bio-Rad). Les membranes sont ensuite incubées 1 h dans du lait 5 % afin de bloquer les sites aspécifiques de la membrane. Après un lavage de 10 min, les membranes sont incubées 1 h avec les sérums de lapin anti-YhgE et anti-GroEL (dilués au 500<sup>e</sup> dans du lait 5 %). Les membranes sont lavées et après 1 h d'incubation avec des anticorps anti-lapin couplés à la peroxydase de Raifort (dilués au 3000<sup>e</sup> dans du lait) (IgG-HRP ; Biorad), les protéines recombinantes sont détectées à l'aide du kit ECL chimioluminescent (Biorad). La lumière émise par les anticorps secondaires est détectée avec l'imageur Odyssey Fc (LI-COR).

**Tableau 10 Souches (A), plasmides (B) et oligonucléotides (C) utilisés dans cette étude.**

(A)

Souches	Caractéristiques	Résistance(s)	Source ou référence
<i>Escherichia coli</i>			
DH5α	F- Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ( <i>lacZYA_argF</i> ) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> , m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ) <i>phoA supE44 thi_1 gyrA96 relA1</i> λ-		(Anton and Raleigh, 2016, p. 5)
BL21(DE3)	F- <i>ompT hsdSB</i> (rB-mB-) <i>gal dcm rne131</i> (DE3)		(Jeong <i>et al.</i> , 2009)
BL21(DE3)_YhgE	BL21(DE3) portant le plasmide pET-28a-YhgE	Kan <sup>r</sup>	Cette étude
BL21(DE3)_GroEL	BL21(DE3) portant le plasmide pET-28a-GroEL	Kan <sup>r</sup>	Cette étude
<i>Lactocaseibacillus casei</i>			
BL23	Souches de laboratoire ; génome séquencé		(Mazé <i>et al.</i> , 2010)
DDB013	BL23 ( <i>lcabl_rs00820</i> ::pRV300)	Ery <sup>r</sup>	Cette étude
DDB002	BL23 contenant pRV002 inséré dans le génome à la position 2,441,492	Ery <sup>r</sup>	(da Silva Barreira David <i>et al.</i> , 2022)

(B)

Plasmides	Caractéristiques	Résistance(s)	Source ou référence
pRV300	Plasmide d'insertion de lactobacilles	Amp <sup>r</sup> , Ery <sup>r</sup>	(Leloup <i>et al.</i> , 1997)
pRV013	pRV300 contenant un fragment de 517 bp du gène <i>lcabl_rs00820</i> , cloné au site EcoRI	Ery <sup>r</sup>	Cette étude
pRV002	pRV300 contenant un fragment de 442 pb d'une région intergénique (comprise entre les gènes <i>lcabl_rs12110</i> et <i>LCABL_RS12115</i> ), cloné aux sites HindIII/SacI	Ery <sup>r</sup>	(da Silva Barreira David <i>et al.</i> , 2022)
pET-28a	Plasmide d'expression de <i>E. coli</i>	Kan <sup>r</sup>	Novagen
pET-28a-YhgE	pET-28a contenant le gène <i>yhgE</i> ( <i>lcabl_rs00820</i> ) sous le contrôle du promoteur T7, cloné aux sites NdeI/EcoRI	Kan <sup>r</sup>	Cette étude

pET-28a-GroEL	pET-28a contenant le gène <i>groel</i> ( <i>lcabl_rs11800</i> ) sous le contrôle du promoteur T7, cloné aux sites NdeI/EcoRI	Kan <sup>r</sup>	Cette étude
---------------	--	------------------	-------------

Ery<sup>r</sup>, érythromycine résistante ; Amp<sup>r</sup>, ampicilline résistante ; Kan<sup>r</sup>, kanamycine résistante.

(C)

Oligonucléotides	Séquence (5' _3')
Construction des plasmides pRV013, pRV002	
<i>P013_FD</i>	GGTATTGAATTCCCACTTGCTAGGTTTGTCGTAC
<i>P013_RV</i>	GGTATTGAATTCTTGGCTGGCATTTCGTTTCTG
<i>P002_FD</i>	GCACACAAGCTTTGCCAACTCCGCAATCTCC
<i>P002_RV</i>	AGTCTTGAGCTCTTTTACGCTCTATGACACGCAC
Construction des plasmides pET-28a-YhgE et pET-28a-GroEL	
<i>P_yhgE_FD</i>	TCCCTGCATATGATCAAAGATGAATTTAAGTTCATCGGC
<i>P_yhgE_RV</i>	TGTGGTGAATTCTTATTTTCGACAGCTTGGAGCTTTTG
<i>P_groel_FD</i>	CCTACGCATATGGCAAAGAAATTAATTCTCTGAAG
<i>P_groel_RV</i>	TCTCCGAATTCTTACATCATACCGCCCATGC

FD, forward; RV, reverse

### 2.2.3 Résultats – Discussion

Afin de développer des anticorps dirigés contre les vésicules de *L. casei* BL23, nous nous sommes appuyés sur les analyses protéomiques des fractions vésiculaires publiées par Rubio *et al.* (2017) ainsi que sur nos propres résultats publiés dans da Silva Barreira *et al.* (2022). Nos résultats ont montré une composition protéique des vésicules de *L. casei* BL23 similaire à celle publiée par Rubio *et al.* (2017). Toutefois, un plus grand nombre de protéines a pu être identifié dans nos travaux grâce à l'analyse séparée des protéines majoritaires du reste de l'échantillon, comme expliqué dans le matériel et méthode de da Silva Barreira *et al.* (2022).

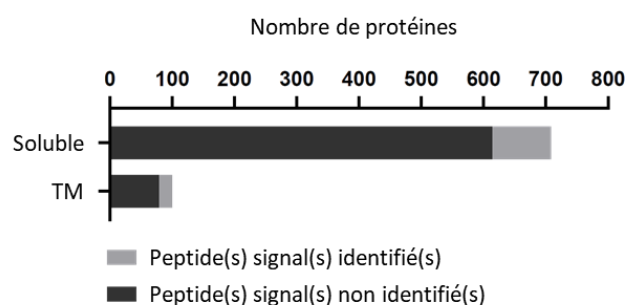


Fig. 39 Prédiction de la solubilité et de la présence de peptides signaux dans les protéines des fractions vésiculaires de *L. casei* BL23. Les protéines détectées par spectrométrie de masse ont été analysées avec le logiciel Phobius. TM: Domaine(s) transmembranaire(s) détecté(s); Soluble: Domaine(s) transmembranaire(s) non détecté(s).

Plus de 10 % des protéines identifiées dans les fractions vésiculaires présentent au moins un domaine transmembranaire selon les prédictions réalisées par le logiciel Phobius (Fig. 39). Parmi les protéines identifiées, une protéine transmembranaire et une protéine soluble ont été choisies comme marqueurs des vésicules pour la production d'anticorps. Ainsi, la protéine transmembranaire qui a été

choisie est une protéine de 97 kDa appelée YhgE (LCABL\_RS00820) (Fig. 40). Cette protéine présente l'avantage d'être présente en quantité importante dans les fractions vésiculaires, elle possède plusieurs domaines transmembranaires et elle a également été identifiée par Rubio *et al.* (2017) (Fig. 40A). De plus, cette protéine présente un large domaine de 688 acides aminés exposé dans milieu extracellulaire, ce qui pourrait ainsi faciliter l'interaction des anticorps avec les YhgE présentes à la surface des vésicules. Cette dernière caractéristique rend ainsi théoriquement possible l'immunomarquage des vésicules (ex. immunogold, immunofluorescence) ainsi que leur purification par immunocapture (Coumans *et al.*, 2017; Morales-Kastresana and Jones, 2017).

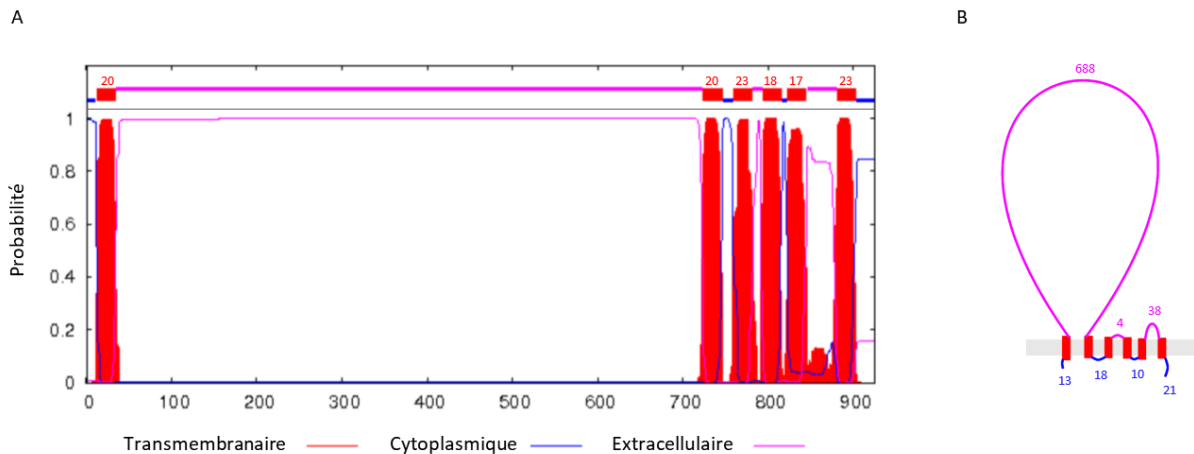


Fig. 40 Prédiction de la topologie transmembranaire de la protéine YhgE (LCABL\_RS00820) avec le logiciel Phobius. (A) Le graphique donne la probabilité qu'un résidu appartienne à une hélice transmembranaire, qu'il soit présent dans le compartiment cytoplasmique ou extracellulaire. (B) Schéma illustrant la topologie de la protéine YhgE.

Les fonctions jouées par la protéine YhgE dans *L. casei* BL23 sont inconnues. Toutefois, YhgE fait partie d'une famille de protéines membranaires exprimées par de nombreuses bactéries à Gram positif. L'un de ses membres s'est révélé être une protéine d'adsorption essentielle à l'infection par un phage de *Lactococcus lactis* (Geller *et al.*, 1993, p. 2). C'est pourquoi de nombreux membres de cette famille sont appelés « protéine d'infection phagique » (PIP; phage infection protein). Il serait intéressant de déterminer si YhgE joue également un rôle de récepteur pour un phage infectant *L. casei* BL23. Cette protéine étant présente en grande quantité dans les vésicules, on pourrait imaginer qu'elles puissent permettre d'augmenter la résistance aux bactériophages en jouant un rôle de leurre comme décrit chez *Escherichia coli* (Manning and Kuehn, 2011).

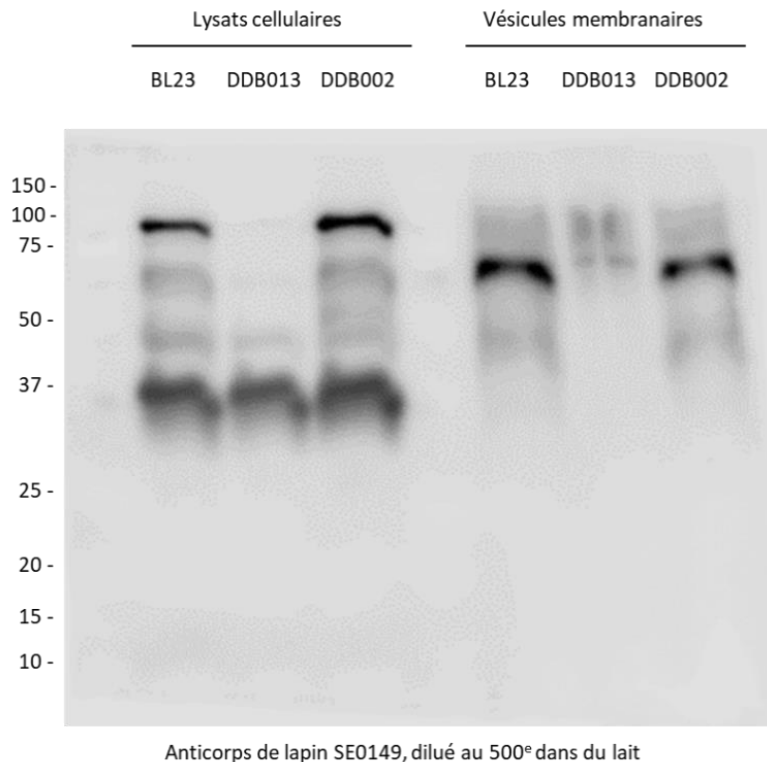


Fig. 41 Vérification par Immunoempreinte (ou Western blot) de la spécificité des anticorps SE0149 dirigés contre YhgE. Un western blot a été réalisé sur des lysats cellulaires et sur les vésicules membranaires de la souche parentale BL23, de la souche contrôle DDB002 et d'une souche de *L. casei* BL23 mutée pour le gène *yhgE* (DDB013). Comme expliqué dans la figure 38, la souche DDB002 correspond à une souche contrôle possédant le plasmide pRV300 inséré dans une région intergénique. Les standards de poids moléculaire sont indiqués à gauche (kDa).

La spécificité des anticorps présents dans le sérum de lapin immunisé par YhgE a été vérifiée par WB (Western blot) sur des vésicules purifiées et des lysats cellulaires de plusieurs souches de *L. casei* BL23. La souche DDB013 est une souche mutée pour le gène *yhgE*, qui a été construite pour contrôler la spécificité des anticorps présents dans le sérum. Les souches BL23 et DDB002 correspondent à la souche parentale et à une souche contrôle respectivement (Fig. 41). Les anticorps du sérum SE0149 reconnaissent fortement une protéine d'environ 97 kDa dans le lysat cellulaire de la souche BL23 et DDB002, alors que cette protéine n'est pas détectée dans le lysat de DDB013. Ce résultat démontre que le sérum de lapin contient des anticorps dirigés contre la protéine YhgE. De manière intéressante, il est à noter que la protéine YhgE est présente sous 2 formes dans la cellule. YhgE est présente sous une forme non tronquée de 97 kDa et sous une forme tronquée d'environ 70 kDa qui est majoritaire dans les vésicules libérées par *L. casei*. Par ailleurs, les anticorps du sérum interagissent de manière aspécifique avec une protéine d'environ 37 kDa et dans une moindre mesure avec une protéine d'environ 40 kDa présentes dans les lysats cellulaires. Cette aspécificité est à prendre en considération pour certaines applications telles que les immunomarquages en présence des bactéries entières de *L. casei* BL23. Toutefois, il est peu probable que ces protéines reconnues de manière aspécifiques soient présentes dans des échantillons eucaryotes. Par ailleurs, l'aspécificité des anticorps pour le contenu protéique des fractions vésiculaires apparaît négligeable. Enfin, bien que ces anticorps présentent une bonne spécificité, nous recommandons de vérifier la réactivité croisée de ces anticorps lors de leur utilisation pour des marquages sur des modèles eucaryotes ou procaryotes.

Nous avons également choisi de développer des anticorps dirigés contre une protéine soluble de 57 kDa appelée GroEL (LCABL\_RS11800) (Fig. 41). La protéine de choc thermique GroEL est une protéine connue pour son rôle de chaperon moléculaire (Hayer-Hartl *et al.*, 2016). De plus, les travaux du laboratoire ont montré que l'activité anti-inflammatoire du surnageant de culture de *L. paracasei* ATCC334 est associée à la présence de GroEL (Rieu *et al.*, 2014). De même, il a été montré que la protéine GroEL de *L. reuteri* prévient l'inflammation du côlon sur des modèles murins (Dias *et al.*, 2021). Notons que les protéines GroEL de *L. paracasei* ATCC334 et de *L. casei* BL23 présentent 100 % de similarité de séquences. La protéine GroEL présente l'avantage d'être présente dans un grand nombre de bactéries ce qui offre la possibilité d'utiliser les anticorps sur diverses vésicules de lactobacilles. De plus, GroEL a également été identifiée dans les vésicules de *L. casei* BL23 par l'analyse protéomique de Rubio *et al.*, 2017. Étant donné que GroEL est une protéine essentielle, nous n'avons pas pu obtenir de souches de *L. casei* BL23 mutée. C'est pourquoi la spécificité des anticorps présents dans le sérum d'un lapin immunisé par GroEL a été analysée par WB sur des échantillons de lysats cellulaires de *L. casei* BL23 et d'*Escherichia coli* BL21 (DE3) exprimant la protéine GroEL (Fig. 42).

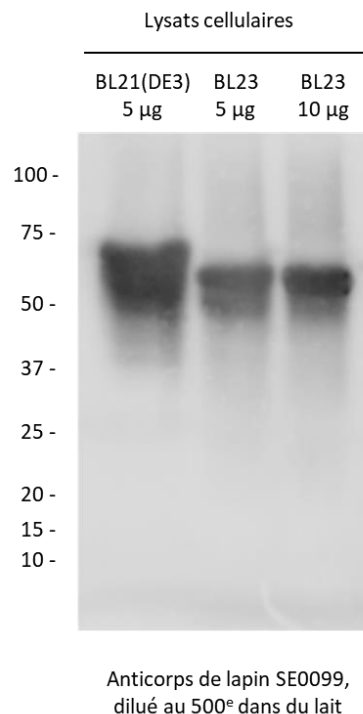


Fig. 42 Vérification par Immunoempreinte (ou Western blot) de la spécificité des anticorps SE0099 dirigés contre GroEL. Un western blot a été réalisé sur des lysats cellulaires de la souche *Escherichia coli* BL21 (DE3) exprimant la protéine GroEL de *L. casei* BL23 et des lysats de la souche BL23 cultivée en conditions standards. 5 et 10 µg de lysats protéiques de BL23 et 5 µg de lysats protéiques de BL21 (DE3) ont été déposés sur le gel d'acrylamide. Les standards de poids moléculaire sont indiqués à gauche (kDa).

Le sérum SE0099 présente des anticorps reconnaissant la protéine GroEL avec une bonne affinité et une bonne spécificité (Fig. 42). En effet, aucune bande aspécifique n'est observable. Toutefois, comme précédemment, nous recommandons de vérifier la réactivité croisée de ces anticorps lors de leur

utilisation pour des marquages sur des modèles eucaryotes ou procaryotes. L'utilisation de ce sérum pour réaliser un WB sur des échantillons protéiques de vésicules devrait être fait prochainement.

#### **2.2.4 Conclusions – perspectives**

Dans l'ensemble, ces résultats montrent que nous avons réussi à développer des anticorps dirigés contre une protéine transmembranaire (YhgE) et une protéine soluble (GroEL) identifiées dans les fractions vésiculaires de *L. casei* BL23. Les anticorps présentent une bonne affinité et une bonne spécificité ce qui permettra leur utilisation pour de futures analyses des vésicules. Ces anticorps pourront être utilisés pour réaliser des immunomarquages ainsi que pour purifier les vésicules par immunocapture. De plus, le fait d'avoir des anticorps dirigés à la fois contre une protéine membranaire et une protéine soluble offre la possibilité d'étudier la demi-vie des vésicules et leur capacité à protéger leur contenu de l'environnement. Cette question est particulièrement importante dans le cadre de l'utilisation industrielle ou thérapeutique des vésicules.

Enfin, dans le cadre ce travail nous avons également observé que la protéine transmembranaire YhgE est présente majoritairement sous une forme tronquée dans les vésicules de *L. casei* BL23. Il serait intéressant d'identifier les mécanismes responsables de ce phénomène étant donné qu'ils pourraient être liés à la biogenèse des vésicules. En effet, l'enrichissement de la forme tronquée de YhgE pourrait s'effectuer préférentiellement dans les bactéries productrices de vésicules ou bien être le résultat d'un enrichissement de cette protéine au niveau de domaines membranaires favorisant la production de vésicules. Cette modification pourrait également être un mécanisme de régulation de l'activité YhgE.



## Chapitre 2 : Rôles des MVs de *Lacticaseibacillus casei* BL23

### 1. Article 2 : Rôle antibiofilm des vésicules membranaires de *Lacticaseibacillus casei* BL23

Titre : « Membrane vesicles released by *Lacticaseibacillus casei* BL23 inhibit the biofilm formation of *Salmonella Enteritidis* ».

David da Silva Barreira, Julie Laurent, Jessica Lourenço, Julia Novion Ducassou, Yohann Couté, Jean Guzzo and Aurélie Rieu

En révision dans Scientific Reports

Ces travaux font également l'objet d'une demande de brevet international intitulée « Utilisation antibiofilm de vésicules membranaires extracellulaires », numéro PCT/FR2021/052374 (cf. Annexe).

Résumé :

Les biofilms représentent une préoccupation majeure dans l'industrie alimentaire et dans le secteur de la santé. Les biofilms sont difficiles à éliminer, ils participent à l'émergence de résistances antimicrobiennes, ils contaminent les aliments et ils sont responsables de la majorité des infections chroniques chez l'Homme. L'échec des traitements conventionnels pour lutter contre les biofilms rend nécessaire la recherche d'alternatives pour prévenir leur développement. L'utilisation de bactéries probiotiques et leurs dérivés est une option prometteuse qui a fourni des résultats convaincants au cours des dernières décennies. Récemment, la production de vésicules membranaires (MVs) (aussi appelées vésicules extracellulaires) par les bactéries à Gram positif et les probiotiques suscite un intérêt considérable en raison de la diversité des rôles auxquels elles sont associées. Dans ce travail, nous avons montré que les MVs produites par *Lacticaseibacillus casei* BL23 (LC-MVs) exercent une forte activité antibiofilm contre *S. Enteritidis* sans affecter la croissance bactérienne. De plus, nous avons observé que les LC-MVs affectent les étapes précoces du développement des biofilms de *S. Enteritidis* et empêchent l'attachement des bactéries à des surfaces de polystyrène. De manière intéressante, les LC-MVs n'ont pas d'effet sur la biomasse de biofilm déjà établi. Nous avons également démontré que l'activité antibiofilm dépend de la présence de protéines associées à la fraction de LC-MVs. Enfin, deux hydrolases du peptidoglycane (PGHs) sont impliquées dans l'activité antibiofilm des LC-MVs.

Dans l'ensemble, notre travail fournit un nouveau rôle joué par les vésicules de bactéries à Gram positif et ouvre la voie à l'utilisation des vésicules de probiotiques pour lutter contre le développement de biofilms négatifs.



## Membrane vesicles released by *Lactocaseibacillus casei* BL23 inhibit the biofilm formation of *Salmonella* Enteritidis

David da Silva Barreira<sup>a</sup>, Julie Laurent<sup>a</sup>, Jessica Lourenço<sup>a</sup>, Julia Novion Ducassou<sup>b</sup>, Yohann Couté<sup>b</sup>, Jean Guzzo<sup>a</sup> and Aurélie Rieu<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Université de Bourgogne Franche-Comté (UBFC), AgroSup Dijon, UMR PAM A 02.102, F-21000 Dijon, France.*

<sup>b</sup> *Univ. Grenoble Alpes, INSERM, CEA, UMR BioSanté U1292, CNRS, CEA, FR2048, 38000 Grenoble, France.*

Correspondence: Aurélie Rieu ([aurelie.rieu@u-bourgogne.fr](mailto:aurelie.rieu@u-bourgogne.fr))

Keywords: Membrane vesicles; antibiofilm activity; probiotics; *Lactocaseibacillus casei*; *Salmonella* Enteritidis biofilms.

### ABSTRACT

In recent decades, the use of probiotic bacteria and their derivatives has shown promising results as an alternative to conventional treatments to fight biofilms development.

In this work, we showed that MVs produced by *Lactocaseibacillus casei* BL23 (LC-MVs) exhibit strong antibiofilm activity against *S. Enteritidis* without affecting bacterial growth. Furthermore, we found that LC-MVs affected the early stages of *S. Enteritidis* biofilm development and prevented attachment of bacteria to polystyrene surfaces. Importantly, we observed that LC-MVs had no impact on the biomass of already established biofilms. We also demonstrated that the antibiofilm activity depended on the proteins associated with the LC-MV fraction. Finally, two peptidoglycan hydrolases (PGHs) were found to be associated with the antibiofilm activity of LC-MVs.

Overall, our work provides a new insight into the role of Gram-positive MVs and paves the way for the use of probiotic MVs against the development of negative biofilms.

## INTRODUCTION

The biofilm mode of life is predominant in nature and is characterized by the emergence of specific physiological properties compared with single planktonic cells<sup>1</sup>. Biofilms are defined as spatially organized communities of microorganisms embedded in a self-produced matrix of extracellular polymeric substances (EPS) that adhere to each other and/or an interface<sup>2,3</sup>. The matrix is a major structural element that contributes to the mechanical stability of biofilms, and the adhesion and immobilization of cells<sup>4</sup>. It contains a diversity of elements including polysaccharides, proteins, nucleic acids, lipids and membrane vesicles (MVs) (also referred to as extracellular vesicles). Both the matrix and cell activities lead to the development of physiochemical gradients (nutrient level, oxygen, redox, pH) within biofilms which result in cellular heterogeneity.

This heterogeneity and the protection provided by biofilms are key factors explaining the high resistance of bacteria to a variety of stresses, such as ultraviolet light<sup>5-7</sup>, phages<sup>8</sup>, desiccation<sup>7</sup>, temperature<sup>9</sup>, host immune systems<sup>10,11</sup> and antibiotics<sup>12,13</sup>. Notably, it has been reported that bacterial biofilms were up to 1000 times more resistant to antibiotic treatments than planktonic cells<sup>14</sup>.

The high resistance of biofilms to antibiotics is a major issue in healthcare as it makes treatments difficult and promotes the emergence of antimicrobial resistances<sup>15-17</sup>. It is estimated that biofilms are involved in approximately 80% of chronic human infections<sup>18</sup> and over 90% of chronic wounds<sup>19</sup>. They are found in the human body and in medical devices such as catheters, pacemakers, endotracheal tubes, and prosthetic implants<sup>20,21</sup>. Biofilms are also a challenge in agri-food industries where they contaminate food, crops and develop on industrial infrastructures such as equipment and water pipelines<sup>22,23</sup>.

*Salmonella enterica* subsp. *enterica* is a major foodborne pathogen which caused 93.8 million gastroenteritis cases worldwide in 2006, resulting in 155 000 deaths<sup>24</sup>. The serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*) is the most common serotype and infects humans through contaminated food such as water, meat, poultry, vegetables, and fruits. *S. Enteritidis* poses considerable difficulties in the food industry since it can form biofilms on diverse surfaces and is often found on eggs and chicken meat.

To address the rise of resistance and the failure of conventional treatments to eliminate biofilms in healthcare and the food industry, new alternatives must be investigated. Probiotics have been found to be effective against biofilms of various *Salmonella* strains<sup>25-27</sup> as well as other pathogens<sup>28-32</sup>.

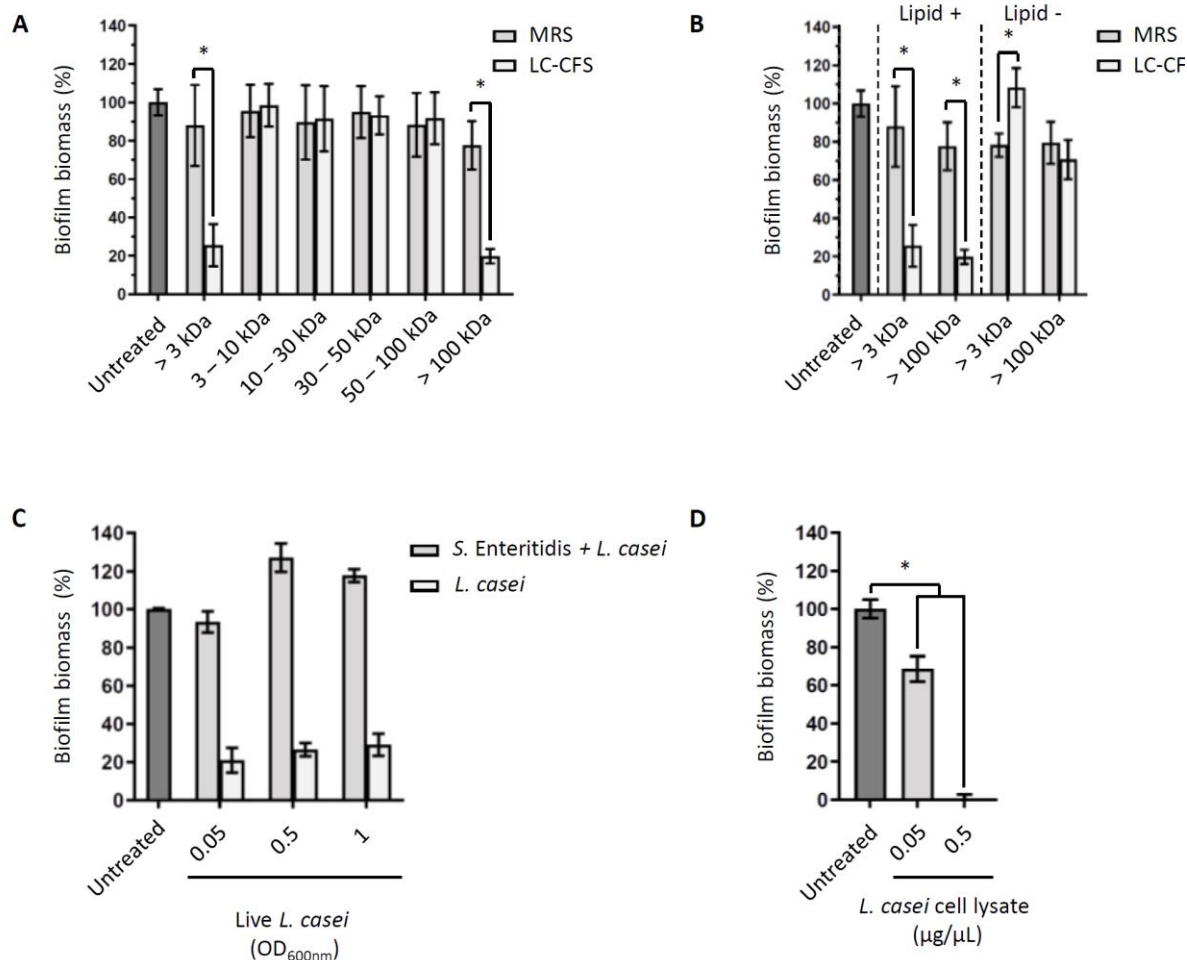
Probiotics are defined by the World Health Organization as "live microorganisms which, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host"<sup>33</sup>. A large number of probiotic bacteria used in the food industry are members of the diverse *Lactobacillaceae* family and are "Generally Regarded as Safe" (GRAS). Lactobacilli are rod shaped Gram-positive bacteria found in a variety of ecological niches including the human gastrointestinal tract. Several members of the *Lactisibacillus casei* species were shown to have antimicrobial properties against various pathogens and were also found to help control bacterial infection, enhance immune response and treat digestive diseases<sup>34</sup>. The mechanisms involved in their antimicrobial effects remain largely unknown and appear to be strain specific<sup>35,36</sup>. The GRAS status of *L. casei* probiotics facilitated their use in healthcare and the food industry, making them good candidates to investigate antimicrobial activities against pathogens such as *Salmonella enterica*. In particular, the dairy strain BL23 of the species *Lactisibacillus casei* (formerly referred to as *Lactobacillus casei*) is known for its beneficial anti-inflammatory properties<sup>37,38</sup> and effects in host defense against pathogens<sup>39,40</sup>. However, to date no works on its antimicrobial activities against pathogens have been published.

Here, we aimed to evaluate the effects of the probiotic strain *L. casei* BL23 on the biofilm formation of *S. Enteritidis*. Our results showed that the cell-free supernatant (LC-CFS) and the cell lysate of *L. casei* BL23 have a strong antibiofilm activity against *S. Enteritidis*, whereas live cells have no significant effect. Furthermore, we demonstrated that membrane vesicles (LC-MVs) released by *L. casei* BL23 contribute to the antibiofilm activity of LC-CFS but have no impact on bacterial growth. In addition, we showed that LC-MVs have a strong antibiofilm effect at the early stage of biofilm formation and no effect on established biofilms of *S. Enteritidis*. Finally, we demonstrated that proteins associated with LC-MVs are responsible for the antibiofilm effects of the vesicles, and two peptidoglycan hydrolases (PGHs) were found to be involved in vesicle activities.

## RESULTS

### **The cell-free supernatant of *L. casei* BL23 contains lipid-based factors of high molecular weight, exhibiting antibiofilm activity against *S. Enteritidis***

To investigate the effect of *L. casei* BL23 on *S. Enteritidis* biofilm formation, we first quantified the biofilm biomass formed after treatment with several fractions of *L. casei* BL23 cell-free supernatant (LC-CFS). To this end, the LC-CFS and the growth medium of the bacteria (i.e. MRS) were fractionated by size-exclusion ultrafiltration to obtain several fractions ranging from 3 kDa to over 100 kDa. *S. Enteritidis* were then inoculated in 96-well plates and treated with the different fractions. Biofilms were finally stained by crystal violet and the relative biomasses were quantified by spectrometry at 595 nm ( $OD_{595}$ ). We observed a strong decrease in biofilm biomass formed by *S. Enteritidis* treated with the LC-CFS fractions containing only molecules larger than 100 kDa (hereinafter referred to as LC-CFS>100) compared to the untreated fraction and the corresponding MRS control fraction (hereinafter referred to as MRS>100) (Fig. 1A). Similarly, we observed that the LC-CFS fractions containing molecules over 3 kDa reduced the biofilm biomass formed by *S. Enteritidis*.



**Fig. 1** *L. casei* BL23 releases lipid components of high molecular weight in the supernatant with antibiofilm properties. (a) *S. Enteritidis* was grown in polystyrene microplates and treated with multiple fractions of *L. casei* cell-free supernatant (LC-CFS) and MRS medium (MRS). After 24 h of culture, the biofilms were quantified by crystal violet staining. The LC-CFS and MRS medium were fractionated by size-exclusion ultrafiltration, generating fractions with molecular weight ranging from 3 kDa to over 100 kDa. (b) The LC-CFS fractions exhibiting an antibiofilm activity and the corresponding MRS fractions were treated with a lipid adsorption matrix to selectively remove all the lipids. Biofilm biomasses of *S. Enteritidis* were then quantified by crystal violet staining after treatment with the fractions in the absence (Lipid -) and in the presence (Lipid +) of lipids. (c) *S. Enteritidis* biofilm formation was quantified after treatment with live *L. casei*. Please note that the control condition “*L. casei*” shows the biomass formed by *L. casei* BL23 in TSB without *S. Enteritidis*. (d) *S. Enteritidis* biofilm formation was quantified after treatment with lysed *L. casei*. All the results were normalized to the untreated conditions and expressed as a percentage.

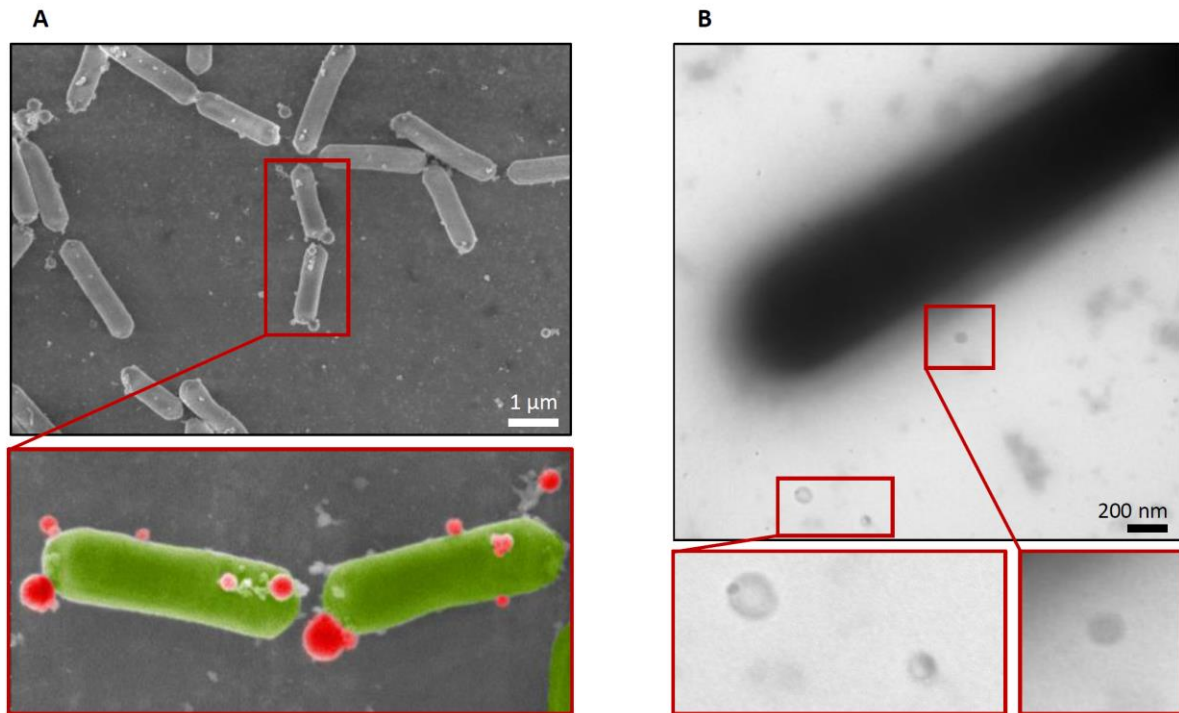
Next, we decided to remove all lipids from LC-CFS>100 and LC-CFS>3 fractions and their corresponding controls (MRS>100 and MRS>3) using a lipid removal reagent. The antibiofilm activity of the delipidated fractions (Lipid-) was then compared to the initial fractions (Lipid+) by crystal violet staining, as described above (Fig. 1B). Unlike with the initial fractions (Lipid+), the results showed that treatment with the delipidated fractions did not decrease the biofilm biomass formed by *S. Enteritidis*. In contrast, we saw a significant increase in biomass formation with the delipidated LC-CFS>3 fraction compared to the control (MRS>3) and the untreated fractions.

To further understand the mechanisms involved in the antibiofilm activity of the LC-CFS, we tested the effect of bacterial cells on the formation of *S. Enteritidis* biofilm. The biofilm biomasses were quantified after the treatment of *S. Enteritidis* with several concentrations of live (Fig. 1C) and lysed *L. casei* BL23 (Fig. 1D). We observed that the treatment with cell lysate resulted in a dose-dependent reduction of biofilm biomasses while treatment with live cells had no negative effects on *S. Enteritidis* biofilm formation (Fig. 1C-D). The “*L. casei*” control conditions (without *S. Enteritidis*) (Fig. 1C) showed that *L. casei* BL23 grown in TSB media formed little or no biofilm, and confirmed that live *L. casei* did not impact the biofilm formation of *S. Enteritidis*. We also noticed (Fig. 1D) that 0.5 µg/µl of cell lysate was sufficient to completely prevent the formation of *S. Enteritidis* biofilm. These data suggest that intracellular components with antibiofilm activities are released by *L. casei* BL23 in the supernatant.

Altogether, our results show that lipid components of high molecular weight with antibiofilm activities are released in the CFS by *L. casei* BL23. Previous work in *L. casei* BL23 has demonstrated that this bacterium releases membrane vesicles (MVs) in the supernatant<sup>41,42</sup>. MVs are lipid nanostructures of high molecular weight described in the literature to have a multitude of roles in the physiology of the bacteria. Importantly, MVs have been described to have positive or negative effects on the structure and on the development of the biofilm of several pathogenic bacteria<sup>43–52</sup>.

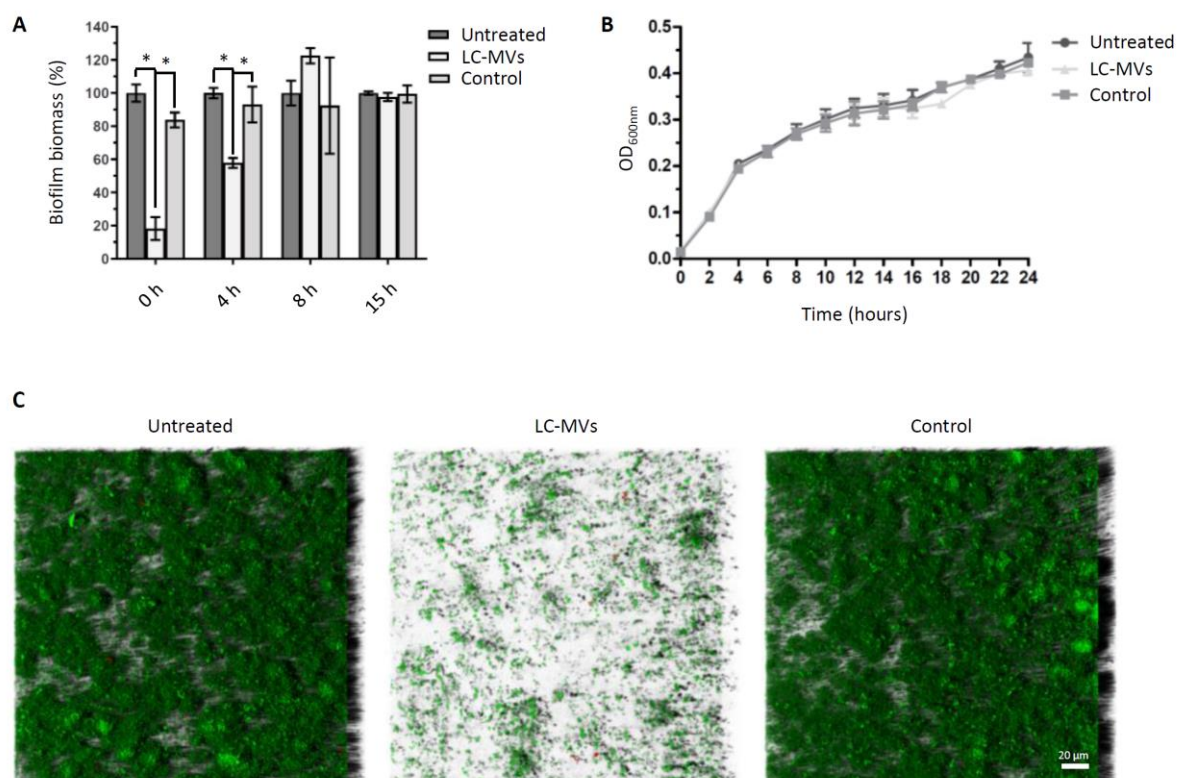
#### **Membrane vesicles released by *L. casei* BL23 inhibit the early stage of *S. enterica* Enteritidis biofilm formation without impacting bacterial growth**

The presence of MVs in the culture medium of *L. casei* BL23 was investigated using scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM). Using SEM, spherical structures were observed in the medium and associated with the surface of bacteria after 24 hours of culture (Fig. 2A). For easier identification and differentiation, these structures were colored in red and bacteria were colored in green in the zoomed-in view (Fig. 2A). MVs were also observed next to the bacteria by negative-staining TEM (Fig. 2B).



**Fig. 2** *L. casei* BL23 release membrane vesicles in the supernatant. SEM. (a) and negative-staining TEM (b) images showing that MVs produced by *L. casei* BL23 are found on the surface of the bacteria and free in the supernatant. The bottom images show a magnified view of each EM images. MVs were colored in red and bacteria were colored in green in the SEM zoomed-in view for better identification.

In order to test whether the MVs released by *L. casei* BL23 (LC-MVs) contribute to the antibiofilm activity exhibited by CFS, MVs were purified and their effect on *S. Enteritidis* biofilm development was analyzed (Fig. 3A). When MVs were added to the culture of *S. Enteritidis* at the time of inoculation (0 h), we observed a reduction of 80% of the biofilm biomass compared to the untreated and control conditions after 24 hours of growth. Moreover, the addition of MVs after 4 hours of culture only induced a 40% decrease of the biofilm biomass compared to the control and untreated conditions. However, after 8 h and 15 h of culture, we noticed that MVs had no effect on the biofilm biomasses formed by *S. Enteritidis*. These results showed that *L. casei* BL23 MVs only affect the biofilm formation of *S. Enteritidis* when they are added early to the bacterial culture. This suggests that LC-MVs have no effect when the biofilm of *S. Enteritidis* is already established (Fig. 3A).



**Fig. 3** Membrane vesicles released by *L. casei* BL23 (LC-MVs) inhibit the early stages of biofilm formation without impacting the growth of *S. Enteritidis*. (a) *S. Enteritidis* was grown in polystyrene microplates and treated with LC-MVs (0.04  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) or a control fraction after 0 h, 4 h, 8 h and 15h of growth. After 24 hours of culture, biofilms were quantified by crystal violet staining. The control corresponds to the fraction collected after carrying out the purification protocol on the culture medium alone (i.e., MRS medium). Results were normalized to the untreated conditions and expressed as a percentage. (b) Comparison of *S. Enteritidis* growth curves in the absence and in the presence of treatment with LC-MVs (0.04  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) and the control fraction. (c) The biofilms formed by *S. Enteritidis* after 24 h of culture in the absence or in the presence of treatment with LC-MVs (0.04  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) were stained (live/dead; SYTO 9/propidium iodide) and imaged by confocal laser scanning microscopy (CLSM). Green: total biomass. Red: dead cells.

The effects of LC-MVs on the biofilm formation of several pathogenic and commensal bacteria was also investigated (Fig. S1). We observed that LC-MVs decrease the biofilm biomass of several bacteria with a variable degree of efficiency depending on the species. Furthermore, it was found that LC-MVs had an activity against both Gram positive and Gram negative bacteria (Fig. S1).

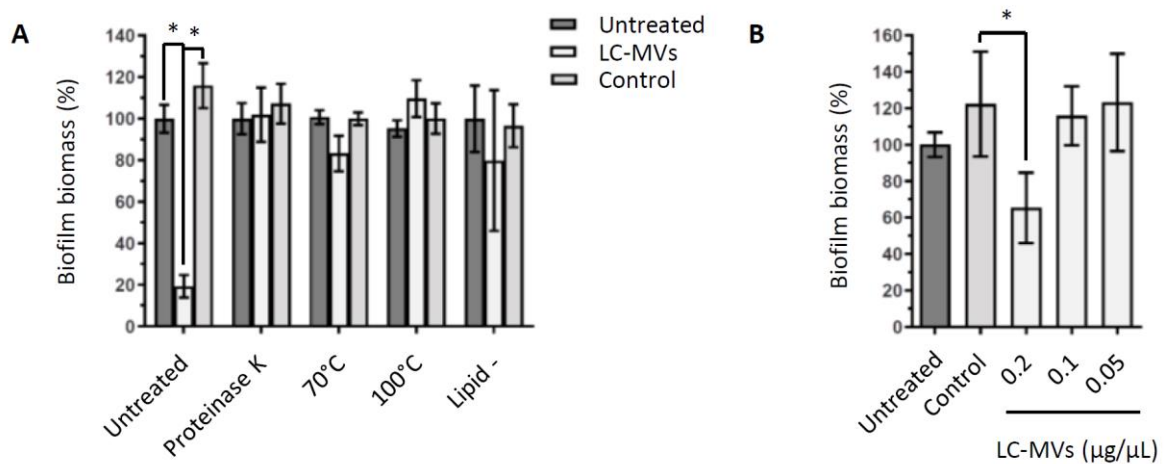
Interestingly, we noticed that LC-MVs had no effect on the growth curve of *S. Enteritidis*. This result proved that the antibiofilm properties of MVs were associated neither with bactericidal nor bacteriostatic activities (Fig. 3B).

The impact of MVs on the biofilm development of *S. Enteritidis* was further analyzed by confocal fluorescence microscopy. After 24 hours of culture, we observed in the control and the untreated conditions that *S. Enteritidis* covered the bottom of wells with microcolonies attached to the polystyrene surface. In contrast, bacteria grown with LC-MVs were freely moving in medium and only a few were attached to the polystyrene surface (Fig. 3C).

Taken together, our results suggest that LC-MVs inhibit the early stage of *S. Enteritidis* biofilm formation. Furthermore, it is noteworthy that the antibiofilm properties of the MVs were associated with neither a bactericidal nor a bacteriostatic activity.

### The antibiofilm activity of *L. casei* BL23 membrane vesicles is sensitive to temperature and proteinase K digestion

MVs consist of lipids, proteins and can also contain nucleic acids, sugars or other polymers. The composition of MVs depends on the organism that produces them and its physiological state<sup>53–56</sup>. To gain more information on the antibiofilm properties of LC-MVs, we aimed to identify the molecular nature of the factors responsible for their activity. To do this, we subjected the LC-MVs to heat treatment or proteinase K digestion before testing their influence on the biomass formed by *S. Enteritidis* biofilm. We observed that both treatments eliminated the antibiofilm activity of LC-MVs (Fig. 4A). Consistent with our previous results, we also found that the MV fraction lost its antibiofilm activity against *S. Enteritidis* biofilm after lipid removal. To examine whether lipids could be responsible for the antibiofilm effects, we tested the effect of liposomes with a lipid composition similar to vesicles on the biofilm formation of *S. Enteritidis* (Fig. S2). Our results showed that the presence of liposomes increased the biofilm biomass of *S. Enteritidis*, suggesting that the lipid membranes of LC-MVs did not contribute to their antibiofilm activities (Fig. S2).



**Fig. 4** The antibiofilm activity of LC-MVs is sensitive to heat and proteinase K treatment. (a) LC-MVs and the control fraction were subjected to proteinase K treatment, heat inactivation (10 min at 70°C and 100°C) and lipid removal using a lipid adsorption reagent. Biofilm biomasses of *S. Enteritidis* were then quantified by crystal violet staining after adding the treated MVs and control fractions. (b) *S. Enteritidis* was incubated with increasing quantities of LC-MVs for 30min at 37°C before inoculation in polystyrene microplates. After 24 h of culture, the biofilm biomasses were quantified by crystal violet staining.

Next, we wanted to investigate whether a short pretreatment with LC-MVs would impact the biofilm formed by *S. Enteritidis*. To this end, *S. Enteritidis* was treated 30 min at 37°C with increasing concentrations of LC-MVs. The bacteria were then washed twice to remove the LC-MVs before inoculation in 96-well plates. After 24 hours of growth, the biofilm biomasses formed by *S. Enteritidis* were quantified by crystal violet staining. We observed a significant reduction in biofilm biomass for

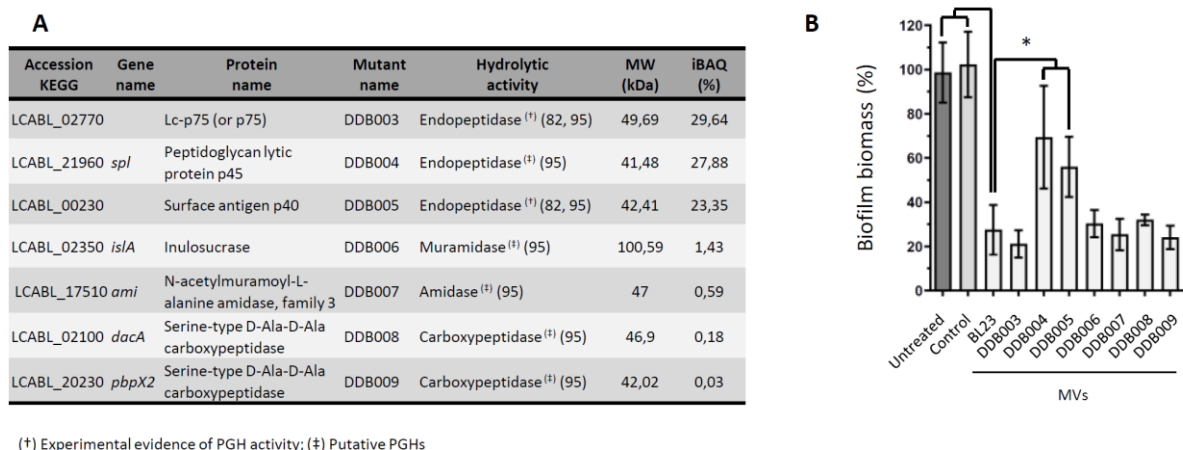


pretreatment with 0.2  $\mu\text{g} / \mu\text{L}$  of LC-MVs (Fig. 4B). This result suggests that LC-MVs had an effect on *S. Enteritidis* cells which resulted in the inhibition of bacterial attachment to the polystyrene surfaces. Altogether, these results suggest that proteins associated with LC-MVs are involved in antibiofilm activities against *S. Enteritidis*. In addition, it appears that LC-MVs are able to inhibit the attachment of *S. Enteritidis* to polystyrene surfaces, thus preventing biofilm development.

### The antibiofilm activity of *L. casei* MVs depends on two peptidoglycan hydrolases

The protein composition of LC-MVs was then analyzed in order to identify the proteins involved in their antibiofilm activities. LC-MVs were first compared to vesicles purified by density gradient ultracentrifugation (LC-pMVs) in order to control the quality of our samples. The relative abundances of proteins present in the vesicles before (LC-MVs) and after (LC-pMVs) density gradient purification were analyzed and the results are shown Figure S3A. The statistical analysis indicates that no proteins could be qualified as significantly differentially abundant, even with a false positive rate reaching 10% according to the Benjamini-Hochberg correction. These results showed that the protein composition of LC-MVs was not significantly different before and after density gradient purification. In agreement with these results, we observed that similar to LC-MVs, the vesicles purified by density gradient exhibited antibiofilm activity against *S. Enteritidis* (Fig. S3B). These results confirmed that LC-MVs and their protein content are involved in antibiofilm activities.

Based on the present analysis of the LC-MVs composition (Table S1), we selected and mutated genes that could be involved in the antibiofilm activity of the vesicles. Mutants were obtained by integration of a non-replicative plasmid in the bacterial genome. The selected genes encoding peptidoglycan hydrolases (PGHs) are listed in Figure 5A and correspond to the most abundant proteins detected in the LC-MV fraction.



**Fig. 5** Mutation of two of the most abundant proteins in the vesicular fraction partially suppresses the antibiofilm activities of LC-MVs against *S. Enteritidis*. (a) List of the peptidoglycan hydrolases (PGHs) detected with the vesicles of *L. casei* BL23 and selected for mutagenesis. The column “Mutant name” indicates the names of the mutant strains obtained by the insertion of a non-replicative plasmid into genes of *L. casei* encoding PGHs. (b) The MVs of the mutant strains were purified and their antibiofilm activity against *S. Enteritidis* was analyzed, as described previously. For each condition, *S. Enteritidis* was treated with a final quantity of 0.04  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  of MVs.

To investigate the PGH contribution to the antibiofilm activity of LC-MVs, we purified the MVs released by each mutant strain and quantified the effect of 0.04 µg/µL of the MVs on *S. Enteritidis* biofilm formation by crystal violet staining. Interestingly, we saw that the biofilm biomass formed by *S. Enteritidis* treated with the MVs purified from the DDB004 (LCABL\_21960::pRV004) and DDB005 (LCABL\_00230::pRV005), was twice as high compared to the biofilm biomass formed after treatment with parental strain MVs (referred to as BL23) (Fig. 5B). The MVs released by the strains DDB004 and DDB005 thus had a significantly lower antibiofilm effect on *S. Enteritidis* compared to the MVs released by the parental strain (Fig. 5B). Moreover, the mutation of other genes encoding PGHs did not seem to impact the antibiofilm activity of LC-MVs (Fig. 5B). These results showed that the PGHs LCABL\_21960 and LCABL\_00230 contribute to the antibiofilm activity of LC-MVs.

## DISCUSSION

Several bacteria of the *Lactobacillaceae* family have been shown to exert antimicrobial and antibiofilm activities against a broad spectrum of pathogenic and commensal bacteria<sup>31,32</sup>. The molecular mechanisms involved in the antagonistic activities of lactobacilli seem to depend on the species and remain largely unknown. The literature indicates that the biofilms of pathogens can be inhibited by live bacteria by competition, displacement or exclusion<sup>31</sup>. Moreover, cellular components and products secreted by lactobacilli have also been reported to exhibit strong antimicrobial and antibiofilm effects<sup>32,57,58</sup>. In this work, we showed that lipid components present in the high molecular weight fraction of LC-CFS displayed antibiofilm activities against *S. Enteritidis*. In addition, we observed that *S. Enteritidis* biofilm was not affected by live bacteria while cell lysate exerted a strong antibiofilm effect, suggesting that *L. casei* BL23 released cellular components with antibiofilm properties in the supernatant. Both these results led us to hypothesize that MVs released by *L. casei* BL23 could contribute to the antibiofilm effects of the CFS against *S. Enteritidis*.

Previous works have demonstrated that *L. casei* BL23 grown in standard conditions releases MVs in the supernatant<sup>41,42</sup>. MVs are spherical nanostructures bounded by a bilayered lipid membrane which contain various cellular components including proteins, nucleic acids and other polymers<sup>53,54</sup>. The composition of MVs depends on the species, the mechanism of biogenesis and the physiological state of the bacteria that produce them. This diversity explains that MVs can play various roles in metabolism, quorum sensing, immunomodulation and stress resistance (antibiotics, phage infection); they can also promote bacterial pathogenesis and horizontal gene transfer<sup>56,59</sup>. Notably, it has been shown that MVs are a major component of the biofilm matrix and have a major impact on biofilm formation.

The presence and structural role of MVs in the biofilm matrix have been reported for many bacteria including *Pseudomonas aeruginosa*<sup>43,60,61</sup>, *Mycobacterium ulcerans*<sup>62</sup>, *Helicobacter pylori*<sup>44,45</sup>, *Myxococcus xanthus*<sup>63,64</sup>, *Streptococcus mutans*<sup>46</sup>. Moreover, the promoting effects of MVs on biofilm formation were proven for bacteria such as *Helicobacter pylori*<sup>44</sup>, *Pseudomonas putida*<sup>48</sup>, *Streptococcus mutans*<sup>46,47</sup>, *Aeromonas spp.*<sup>49</sup>, *Pseudomonas aeruginosa*<sup>65</sup>. In agreement with the literature, we found that the treatment of *S. Enteritidis* with liposomes increased the biofilm biomass after 24 h of culture. In contrast, the antibiofilm effects of MVs released by several bacteria have also been reported. The mechanisms of inhibition identified are diverse and seem to be strain dependent. In particular, it has been shown that MVs produced by *Paracoccus denitrificans* carry quorum sensing molecules which inhibit biofilm formation<sup>66</sup>. Similarly, the bactericidal effects of *Lactobacillus plantarum* and *Burkholderia thailandensis* MVs have been shown to inhibit biofilm development<sup>50,51</sup>.

In *P. aeruginosa*, the secretion of a leucine aminopeptidase PaAP via MVs was also shown to disrupt biofilms<sup>52</sup>.

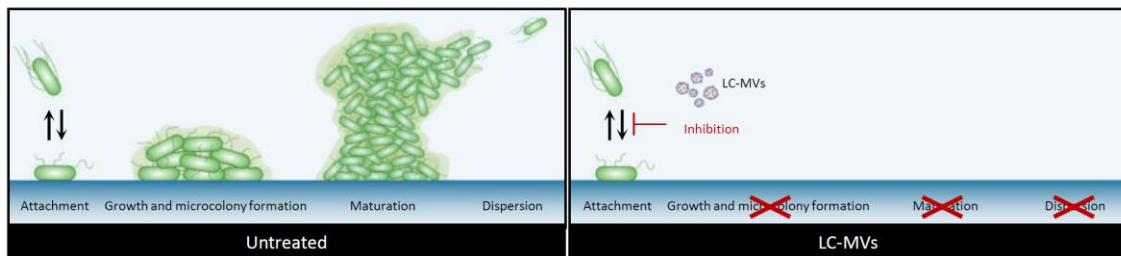
Our results showed that the addition of LC-MVs to a starting culture of *S. Enteritidis*, *H. alvei*, *C. freundii*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. epidermidis*, *E. faecalis* reduces the biofilm biomass formed after 24 hours of culture by the bacteria. For unknown reasons, we noticed that *S. Enteritidis* was the bacteria most affected by the antibiofilm activity of *L. casei* MVs with an 80 % decrease in biofilm biomass. Furthermore, we observed that the earlier MVs were added to *S. Enteritidis* cultures, the lower the biofilm biomasses measured after 24 hours of growth. This result suggests that LC-MVs do not disrupt already established *S. Enteritidis* biofilms. Interestingly, we showed that the antibiofilm properties of LC-MVs were not due to bactericidal or bacteriostatic activities against *S. Enteritidis*, suggesting a specific mechanism of inhibition. In addition, we showed that a short pretreatment of *S. Enteritidis* with LC-MVs was enough to reduce the biofilm biomass formed after 24 hours of culture. Taken together, these results suggest that LC-MVs impact the early stage of *S. Enteritidis* biofilm formation by inhibiting the initial attachment of the bacteria to polystyrene plate surfaces.

The antibiofilm activity of LC-MVs were inactivated by heat and Proteinase K digestion, suggesting that proteins associated with the vesicles were responsible for the MVs activities. This result led us to analyze the protein content of LC-MVs by MS-based proteomics to identify proteins that may contribute to the antibiofilm activity. The present MS-based proteomic analysis (Table S1) allowed us to identify the proteins associated with the LC-MV fraction. Strikingly, we noticed that peptidoglycan hydrolases (PGHs) were among the most abundant proteins of the LC-MV fraction. PGHs are enzymes responsible for the cleavage of covalent bonds within peptidoglycan chains and side-chains which is key for cell wall regulation during bacterial growth<sup>67</sup>. Among the proteins associated with LC-MVs, we identified the three main classes of PGH (amidases, glycosidases and peptidases)<sup>67</sup>. Recent studies have found that PGHs play a major role in MV biogenesis by triggering cell lysis<sup>68</sup> or by creating holes in the PG which allow the extrusion of the cytoplasmic membrane<sup>69-71</sup>. Moreover, it was reported that some PGHs exhibit antibiofilm activities against pathogenic bacteria such as *S. Typhimurium*<sup>72</sup> and *Staphylococci*<sup>73-80</sup>. Lysozyme contained in egg albumen also displays a strong antibiofilm activity against *Gardnerella vaginalis*<sup>81</sup>. Thus, given the multiple roles played by PGHs, we sought to test the involvement in the LC-MV antibiofilm activity of the most abundant PGHs. To do this, the PGHs listed Figure 5A were mutated by plasmid insertion. We observed that mutation of genes encoding the PGHs named LCABL\_21960 and LCABL\_00230 led to a significant reduction in antibiofilm activity of the MVs of both mutant strains compared to the MVs of the parental strain (referred to as BL23). These results showed that the PGHs LCABL\_21960 and LCABL\_00230 are directly or indirectly involved in the antibiofilm activity of LC-MVs. However, the mechanisms responsible for the suppression of the antibiofilm effect remain to be identified. As mentioned in the examples above, mutations of genes encoding the PGHs could lead to modifications in the composition of LC-MVs<sup>69-71</sup>. PGHs could also be involved in biofilm inhibition by directly interacting with *S. Enteritidis*<sup>73-81</sup>. The activity and localization of the protein p40 encoded by LCABL\_0023 have been studied recently in *L. casei* BL23. Notably, the peptidoglycan hydrolase activity of p40 was proven experimentally<sup>82</sup> and several other roles were attributed to the protein<sup>82-84</sup>. In particular, p40 was shown to bind to host cells and host macromolecules (mucin, collagen), activate cell receptors and induce signaling pathways<sup>82-84</sup>. Moreover, this enzyme was described to play a role in the growth and cell division of *L. casei* BL23. p40

was found on cell surfaces at the bacteria poles, and consistent with our results p40 has also been shown to be released into the environment freely<sup>82</sup> or bound to extracellular vesicles<sup>84</sup>.

In this work, we showed that the MVs released by *L. casei* BL23 in the CFS exhibit a strong antibiofilm activity against *S. Enteritidis* without affecting cell growth. The antibiofilm activity of LC-MVs was inactivated by heat and Proteinase K digestion, suggesting the involvement of proteins. Furthermore, we showed that LC-MVs inhibits the early stage of *S. Enteritidis* biofilm formation. Finally, we found that the mutation of two peptidoglycan hydrolases resulted in a significant reduction of LC-MV antibiofilm activity (Fig. 6).

We believe that the antibiofilm activity of LC-MVs represents a promising therapeutic opportunity to fight negative biofilms in the medical sector and the food industry. The combination of LC-MVs to prevent biofilm development with more conventional treatments needs to be further investigated to improve the treatment of challenging negative biofilms.



**Fig. 6** Schematic representation of the effect of LC-MVs treatment on *S. Enteritidis* biofilm formation. Proteins (in red) associated with LC-MVs inhibit the attachment of *S. Enteritidis* on polystyrene surfaces, preventing the formation of biofilm. Two peptidoglycan hydrolases (PGHs) were found to be involved in the antibiofilm activity of LC-MVs.

## METHODS

### Bacterial strains, plasmids and growth conditions

The bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table S2. Unless otherwise specified, *L. casei* strains were grown in Man-Rogosa-Sharpe medium (MRS; Conda) for 24 hours at 37°C under static conditions. *L. casei* mutant strains obtained by plasmid integration were selected in solid MRS (1.5% agar) and maintained in liquid MRS supplemented with 5 µg/mL of erythromycin. *Escherichia coli* DH5α was used as a cloning host and grown in LB medium at 37°C with vigorous agitation (200 rpm). *Escherichia coli* transformants were selected on solid LB (1.5% agar) supplemented with 100 µg/mL of ampicillin. *S. Enteritidis* were propagated in TSB (Tryptic Soy Broth) medium at 37°C with shaking.

### Construction of plasmids and mutant strains

The construction of *L. casei* BL23 insertion mutants was adapted from Leloup *et al.*, 1997 and Juan Rico *et al.*, 2008<sup>85,86</sup>. First, an internal fragment of each gene listed in Table S2 were amplified by PCR (Q5 High-Fidelity DNA polymerase NEB) with the corresponding primers using *L. casei* BL23 genome as a template (accession: NC\_010999). The amplified fragments were then cloned into the suicide vector pRV300 previously digested with a combination of either EcoRI, HindIII or SacI restriction enzymes. The resulting plasmids (named pRV003, pRV004, pRV005, pRV006, pRV007, pRV008, pRV009) were then transformed in *L. casei* BL23 by electroporation using a GenePulser (BioRad), as described in Posno *et al.*, 1991<sup>87</sup>. Transformant bacteria were selected on MRS plates supplemented with 5 µg/mL of erythromycin. The correct integration of the plasmids was validated by PCR and sanger sequencing. The *L. casei* BL23 mutant strains obtained were named DDB003, DDB004, DDB005, DDB006, DDB007, DDB008, DDB009 accordingly.

### Biofilm quantification

*S. Enteritidis* was inoculated in TSB (Tryptic Soy Broth) medium at an optical density (OD<sub>600nm</sub>) of 0.05 measured at a wavelength of 600 nm. Bacteria were then grown in 96-well flat-bottom polystyrene plates (Greiner) at 37°C under static conditions. After 24 hours, *S. Enteritidis* biofilms were washed with distilled water (dH<sub>2</sub>O) and stained for 1 hour at room temperature (RT) with a 0.5% aqueous crystal violet solution. Next, the stained wells were washed 3 times with dH<sub>2</sub>O and the crystal violet-stained biofilms were then solubilized in 95% ethanol solution. Finally, relative biofilm biomasses were quantified at OD<sub>595nm</sub> using the Infinite 200 PRO microplate plate reader (Tecan). The biofilm biomasses of *S. marcescens*, *P. aeruginosa*, *H. alvei*, *C. freundii*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. epidermidis* and *E. faecalis* were measured following the same staining procedure.

### Scanning electron microscopy (SEM)

Bacteria were fixed in 2.5% glutaraldehyde for 30 min and 10 µl of the fixed bacteria were then dropped onto a poly-L-lysine coated silicon wafer. After 30 min of drying, the bacteria were washed with water and post-fixed in 4% osmium tetroxide for 1 hour. After gentle washing in distilled water, cells were dehydrated through a graded series of ethanol baths (from 30 to 100%) and dried by the critical point drying (CPD) method using a Leica CPD 030. Finally, the samples were coated with a thin carbon layer using a CRESSINGTON 308R and observed with a JEOL JSM 7600F scanning electron microscope (JEOL Ltd) at the DimaCell platform (<http://www.dimacell.fr/>).

### Transmission electron microscopy (TEM)

Negative staining was performed on bacterial suspension before observation by TEM at the DimaCell platform (<http://www.dimacell.fr/>). 10 µl of sample was dropped on collodion-coated and carbon-stabilized nickel microscope grids and left for 3 min to allow the MVs, the bacteria or the phages to bind. Excess liquid was gently blotted with Whatman paper and stained with 10 µl of 1% (w/v) uranyl acetate solution for 10 seconds. The grid was dried and observed using a Hitachi H7500 transmission electron microscope (Hitachi Scientific Instruments Co., Tokyo, Japan) operating at 80 kV and equipped with an AMT camera driven by AMT software (AMT, Danvers, MA, USA).

#### MV purification and cell free supernatant fractionation

For MV purification, we used a protocol adapted from a previous study (82). A culture of *L. casei* (250 mL) was centrifuged at 4000 x g, 4°C for 20 min. The supernatant was filtered through a 0.22 µm pore size filter (Nalgen Rapid-Flow) to remove remaining bacterial cells and concentrated by ultrafiltration at 4000 x g, 4°C with 100 K Amicon® Ultra-15 centrifugal filters (Merck Millipore). The concentrated supernatant was filtered through a 0.22-µm-pore-size filter before ultracentrifugation at 110,000 g, 4°C for 2 hours. The pellet of MVs was resuspended in sterile PBS (1X) and stored as aliquots at -80°C. This sample was named LC-MVs. As a control, the same procedure was applied to the MRS culture medium.

For further purification, an MV pellet was loaded on top of an iodoxinol gradient of 5-40% and subjected to ultracentrifugation at 100,000 x g for 18 h at 4°C. The fraction containing the MVs was then collected and resuspended in PBS (1X) before a final ultracentrifugation at 110,000 x g for 2 h at 4°C. Finally, the purified MVs were resuspended in sterile PBS (1X) and stored as aliquots at -80°C. This sample was named LC-pMVs.

The fractionation of the cell-free supernatant of *L. casei* BL23 (LC-CFS) began similarly to the purification of MVs described above. A culture of *L. casei* (250 mL) was centrifuged at 4000 x g, 4°C for 20 min. The supernatant was filtered through a 0.22 µm pore size filter (Nalgen Rapid-Flow) to remove remaining bacterial cells and concentrated by ultrafiltration at 4000 x g, 4°C with 3K Amicon® Ultra-15 centrifugal filters (Merck Millipore) to generate the LC-CFS. It is important to note that the resulting fraction contained all the molecules larger than 3kDa; this fraction is also referred to as LC-CFS>3 in the manuscript. Then the supernatant (LC-CFS>3) was successively fractionated at 4000 x g, 4°C using 100k, 50k, 30k, 10k Amicon® Ultra-15 centrifugal filters. At each step the concentrate fractions were recovered and stored as aliquots at -80°C for later use.

#### Cell lysate preparation

*L. casei* BL23 were washed twice with ice cold phosphate-buffered saline 1X (PBS). Cells were then harvested by centrifugation (5000 x g, 10 min), resuspended in ice cold PBS IX and transferred in sterile 2ml-Precellys tubes pre-filled with inert 0.5 mm glass beads. Bacteria were then lysed with 2 cycles of 30 s using a Precellys24 homogenizer operating at 6500 rpm. The cell lysate was centrifuged (5000 x g, 10 min) and the supernatant was stored as aliquots at -20 °C. Repeated freezing and thawing were avoided by using new aliquots in different experiments.

#### Lipid removal procedure

Lipids and membrane vesicles were removed from samples using a lipid removal reagent (Cleanascite; Biotech Support Group) following the manufacturer's instructions. Briefly, 1 volume of Cleanascite reagent was added to 4 volumes of sample; the solutions were then incubated at RT for 10 min with

gentle shaking. After incubation, samples were centrifuged at 16 000 g for 1 min and supernatants were collected and stored as aliquots at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### Protein digestion of *L. casei* BL23 MVs (LC-MVs)

*L. casei* BL23 MVs were subjected to protein digestion using proteinase K immobilized to agarose (P9290; Sigma-Aldrich). First, the purified MVs and the control fraction were incubated with 1 mg/mL of proteinase K-agarose at  $37^{\circ}\text{C}$  for 1 hour under agitation. The proteinase K-agarose was then removed by centrifugation (15 000 g, 1 min) and the digested fractions were finally stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### Confocal Laser Scanning Microscopy

*S. Enteritidis* was adjusted to an  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  of 0.05 and cultured on 96-well black polystyrene plates with clear flat bottoms (Thermo Scientific) at  $37^{\circ}\text{C}$  under static conditions. After 24 hours, planktonic bacteria were removed and biofilms were washed twice with distilled water ( $\text{dH}_2\text{O}$ ). For visualization, biofilms were labeled with 5  $\mu\text{M}$  of the cell-permeant nucleic acid stain SYTO-9 (Invitrogen) and with 20  $\mu\text{M}$  of the cell-impermeant nucleic acid stain Propidium Iodide (Invitrogen) for 10 min in the dark at RT. Next, samples were observed at RT using a Leica confocal SP8 inverted microscope with a 63 $\times$  oil immersion objective lens (DimaCell platform; <http://www.dimacell.fr/>). A series of horizontal (xz) optical sections with a z-step of 0.75  $\mu\text{m}$  were acquired for each biofilm. Samples were scanned at 3 randomly selected positions. 3D projections of each representative biofilm were reconstructed with the LAS X software (LEICA Microsystems, France).

#### Mass spectrometry-based proteomic analyses

Three independent preparations of extracellular vesicles were analyzed. Proteins were solubilized in Laemmli buffer and heated for 10 min at  $95^{\circ}\text{C}$ . They were then separated by SDS-PAGE (4-12% NuPAGE, Life Technologies), stained with Coomassie blue R-250 (Bio-Rad) before in-gel digestion using modified trypsin (Promega, sequencing grade) as previously described<sup>88</sup>. For each replicate, the two very intense bands were prepared separately from the rest of the sample. The resulting peptides were analyzed by online nanoliquid chromatography coupled to MS/MS (Ultimate 3000 RSLCnano and Orbitrap Exploris 480 for the second experiment, Thermo Fisher Scientific) using a 35-min gradient for intense bands and 120-min gradient for the rest of the samples. To this end, the peptides were sampled on a precolumn (300  $\mu\text{m}$  x 5 mm PepMap C18, Thermo Scientific) and separated in a 75  $\mu\text{m}$  x 250 mm C18 column (Reprosil-Pur 120 C18-AQ, 1.9  $\mu\text{m}$ , Dr. Maisch). The MS and MS/MS data were acquired by Xcalibur (Thermo Fisher Scientific).

Peptides and proteins were identified by Mascot (version 2.7.0.1, Matrix Science) through concomitant searches against the Microscope database<sup>89</sup> (*Lactobacillus casei* BL23 taxonomy, April 2021 download), the Uniprot database (*Saccharomyces cerevisiae* S288c and *Bos Taurus* taxonomies, June 2021 download), and a homemade database containing the sequences of classical contaminant proteins found in proteomic analyses (keratins, trypsin, etc.). Trypsin/P was chosen as the enzyme and two missed cleavages were allowed. Precursor and fragment mass error tolerances were set at respectively at 10 and 20 ppm. Peptide modifications allowed during the search were: Carbamidomethyl (C, fixed), Acetyl (Protein N-term, variable) and Oxidation (M, variable). The Proline software<sup>90</sup> (version 2.1) was used for the compilation, grouping, and filtering of the results (conservation of rank 1 peptides, peptide length  $\geq 6$  amino acids, false discovery rate of peptide-spectrum-match identifications  $< 1\%$ <sup>91</sup>, and a minimum of one specific peptide per identified protein group). Proline was then used to perform an MS1 label-free quantification of the identified protein

groups based on razor and specific peptides. MS data have been deposited at the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository<sup>92</sup> with the dataset identifier PXD036342.

Statistical analysis was performed using the ProStaR software<sup>93</sup> based on the quantitative data obtained with the three biological replicates analyzed per condition. Proteins identified in the contaminant, bovine and yeast databases, proteins identified by MS/MS in less than two replicates of one condition, and proteins detected in less than three replicates of one condition were discarded. After log<sub>2</sub> transformation, abundance values were normalized using the variance stabilizing normalization (vs<sub>n</sub>) method, before missing value imputation using the slsa algorithm. Statistical testing was conducted with limma, whereby differentially expressed proteins were selected using a log<sub>2</sub>(Fold Change) cut-off of 1 and a p-value cut-off of 0.01. The false discovery rate was then estimated using the Benjamini-Hochberg estimator.

Intensity-based absolute quantification (iBAQ,<sup>94</sup>) values were calculated from MS1 intensities of razor and specific peptides. The iBAQ values were normalized by the sum of iBAQ values in each sample, before summing the values of the three replicates to generate the final iBAQ value for each condition.

#### Statistical analysis

The results were calculated from a minimum of 3 biological replicates for all experiments. Statistical analyses were completed using GraphPad Prism (GraphPad Software). Unpaired t tests were used to compare the means of MRS and LC-CFS conditions in Fig. 1A, Fig. 1B, Fig. S1. A one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test were used in Fig. 1C, Fig. 1D, Fig. 3A, Fig. 3B, Fig 4B, Fig S2, Fig S3B. A two-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test were used in Fig. 2A. Error bars represent the standard deviation (SD) with \* indicating that p-values are lower than 0.05. p-values lower than 0.05 were considered significant. For microscopy images, samples were scanned at 3 randomly selected positions and representative images were chosen.

#### DATA AVAILABILITY

Data supporting the findings of this study are available within the paper and its Supplementary Information files. All other data are available from the corresponding author on request.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by the Regional Council of Bourgogne-Franche-Comté, the "Fonds Européen de Développement Régional (FEDER) " and the "Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation". The proteomic experiments were partially supported by the Agence Nationale de la Recherche under the projects ProFI (Proteomics French Infrastructure, ANR-10-INBS-08) and GRAL, a program of the Chemistry Biology Health (CBH) Graduate School of the University Grenoble Alpes (ANR-17-EURE-0003).

The authors would like to thank Aline Bonnotte, Jeannine Lherminier, Elodie Noirot and Laure Avoscan for their help on the DimaCell platform in Dijon, Luis Bermúdez-Humarán for kindly providing the plasmid pRV300 and Keith Hodson for proofreading the manuscript (ACCENT EUROPE).

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

D.D.S. performed experiments, analyzed and interpreted data, designed figures and wrote manuscript; J.La. and J.Lo. provided assistance with performing the experiments; J.N.D performed MS-based proteomics experiments; Y.C. analyzed and interpreted data of MS-based proteomics and revised the



manuscript; J.G. designed and supervised study; A.R. designed and supervised the study and provided assistance with data analysis and interpretation, figure design and manuscript writing.

## ADDITIONAL INFORMATION

**Supplementary information** accompanies the paper on the npj Biofilms and Microbiomes website.

**Competing interests:** The authors declare no competing interests.

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## REFERENCES

1. Flemming, H.-C. & Wuertz, S. Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* **17**, 247–260 , doi:10.1038/s41579-019-0158-9 (2019).
2. Flemming, H.-C. *et al.* Who put the film in biofilm? The migration of a term from wastewater engineering to medicine and beyond. *NPJ Biofilms Microbiomes* **7**, 10 , doi:10.1038/s41522-020-00183-3 (2021).
3. Vert, M. *et al.* Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure Appl. Chem.* **84**, 377–410 , doi:10.1351/PAC-REC-10-12-04 (2012).
4. Flemming, H.-C. & Wingender, J. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 623–633 , doi:10.1038/nrmicro2415 (2010).
5. Elasm, M. O. & Miller, R. V. Study of the response of a biofilm bacterial community to UV radiation. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 2025–2031 (1999).
6. Bernbom, N., Vogel, B. F. & Gram, L. *Listeria monocytogenes* survival of UV-C radiation is enhanced by presence of sodium chloride, organic food material and by bacterial biofilm formation. *Int. J. Food Microbiol.* **147**, 69–73 , doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.009 (2011).
7. Frösler, J., Panitz, C., Wingender, J., Flemming, H.-C. & Rettberg, P. Survival of *Deinococcus geothermalis* in biofilms under desiccation and simulated space and martian conditions. *Astrobiology* **17**, 431–447 , doi:10.1089/ast.2015.1431 (2017).
8. Liu, S., Lu, H., Zhang, S., Shi, Y. & Chen, Q. Phages against pathogenic bacterial biofilms and biofilm-based infections: A Review. *Pharmaceutics* **14**, 427 , doi:10.3390/pharmaceutics14020427 (2022).
9. Williams, H. N., Turng, B.-F. & Kelley, J. I. Survival response of *Bacteriovorax* in surface biofilm versus suspension when stressed by extremes in environmental conditions. *Microb. Ecol.* **58**, 474–484 , doi:10.1007/s00248-009-9499-7 (2009).
10. Roilides, E., Simitsopoulou, M., Katragkou, A. & Walsh, T. J. How biofilms evade host defenses. *Microbiol. Spectr.* **3**, , doi:10.1128/microbiolspec.MB-0012-2014 (2015).
11. Jensen, P. Ø., Givskov, M., Bjarnsholt, T. & Moser, C. The immune system vs. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **59**, 292–305 , doi:10.1111/j.1574-695X.2010.00706.x (2010).
12. Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S. & Ciofu, O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents* **35**, 322–332 , doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011 (2010).
13. Stewart, P. S. & Costerton, J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet Lond. Engl.* **358**, 135–138 , doi:10.1016/s0140-6736(01)05321-1 (2001).
14. Ceri, H. *et al.* The Calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 1771–1776 , doi:10.1128/JCM.37.6.1771-1776.1999 (1999).

15. Hall, C. W. & Mah, T.-F. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **41**, 276–301 , doi:10.1093/femsre/fux010 (2017).
16. Abe, K., Nomura, N. & Suzuki, S. Biofilms: hot spots of horizontal gene transfer (HGT) in aquatic environments, with a focus on a new HGT mechanism. *FEMS Microbiol. Ecol.* **96**, fiae031 , doi:10.1093/femsec/fiae031 (2020).
17. Uruén, C., Chopo-Escuin, G., Tommassen, J., Mainar-Jaime, R. C. & Arenas, J. Biofilms as promoters of bacterial antibiotic resistance and tolerance. *Antibiot. Basel Switz.* **10**, 3 , doi:10.3390/antibiotics10010003 (2020).
18. NIH Guide: RESEARCH ON MICROBIAL BIOFILMS. <https://grants.nih.gov/grants/guide/pa-files/pa-03-047.html>.
19. Attinger, C. & Wolcott, R. Clinically addressing biofilm in chronic wounds. *Adv. Wound Care* **1**, 127–132 , doi:10.1089/wound.2011.0333 (2012).
20. Bjarnsholt, T. *et al.* The *in vivo* biofilm. *Trends Microbiol.* **21**, 466–474 , doi:10.1016/j.tim.2013.06.002 (2013).
21. Arciola, C. R., Campoccia, D. & Montanaro, L. Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion. *Nat. Rev. Microbiol.* **16**, 397–409 , doi:10.1038/s41579-018-0019-y (2018).
22. Wingender, J. & Flemming, H.-C. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **214**, 417–423 , doi:10.1016/j.ijheh.2011.05.009 (2011).
23. Flemming, H.-C. *et al.* Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 563–575 , doi:10.1038/nrmicro.2016.94 (2016).
24. Majowicz, S. E. *et al.* The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **50**, 882–889 , doi:10.1086/650733 (2010).
25. Merino, L., Trejo, F. M., De Antoni, G. & Golowcycz, M. A. *Lactobacillus* strains inhibit biofilm formation of *Salmonella* sp. isolates from poultry. *Food Res. Int. Ott. Ont* **123**, 258–265 , doi:10.1016/j.foodres.2019.04.067 (2019).
26. Shi, S. *et al.* Antagonistic trait of *Lactobacillus reuteri* S5 against *Salmonella enteritidis* and assessment of its potential probiotic characteristics. *Microb. Pathog.* **137**, 103773 , doi:10.1016/j.micpath.2019.103773 (2019).
27. Gómez, N. C., Ramiro, J. M. P., Quecan, B. X. V. & de Melo Franco, B. D. G. Use of potential probiotic Lactic Acid Bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, and *Escherichia coli* O157:H7 Biofilms Formation. *Front. Microbiol.* **7**, 863 , doi:10.3389/fmicb.2016.00863 (2016).
28. Chappell, T. C. & Nair, N. U. Engineered lactobacilli display anti-biofilm and growth suppressing activities against *Pseudomonas aeruginosa*. *NPJ Biofilms Microbiomes* **6**, 48 , doi:10.1038/s41522-020-00156-6 (2020).
29. Kaur, S., Sharma, P., Kalia, N., Singh, J. & Kaur, S. Anti-biofilm properties of the fecal probiotic lactobacilli against *Vibrio* spp. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **8**, 120 , doi:10.3389/fcimb.2018.00120 (2018).
30. Sambanthamoorthy, K., Feng, X., Patel, R., Patel, S. & Parnavitana, C. Antimicrobial and antibiofilm potential of biosurfactants isolated from lactobacilli against multi-drug-resistant pathogens. *BMC Microbiol.* **14**, 197 , doi:10.1186/1471-2180-14-197 (2014).
31. Carvalho, F. M., Teixeira-Santos, R., Mergulhão, F. J. M., Gomes, L. C., & LEPABE—Laboratory for Process Engineering, Environment, Biotechnology and Energy, Faculty of Engineering, University of Porto, Rua Dr. Roberto Frias, 4200-465 Porto, Portugal. Targeting biofilms in medical devices using probiotic cells: a systematic review. *AIMS Mater. Sci.* **8**, 501–523 , doi:10.3934/matensci.2021031 (2021).
32. Giordani, B., Parolin, C. & Vitali, B. Lactobacilli as anti-biofilm strategy in oral infectious diseases: a mini-review. *Front. Med. Technol.* **3**, 769172 , doi:10.3389/fmedt.2021.769172 (2021).

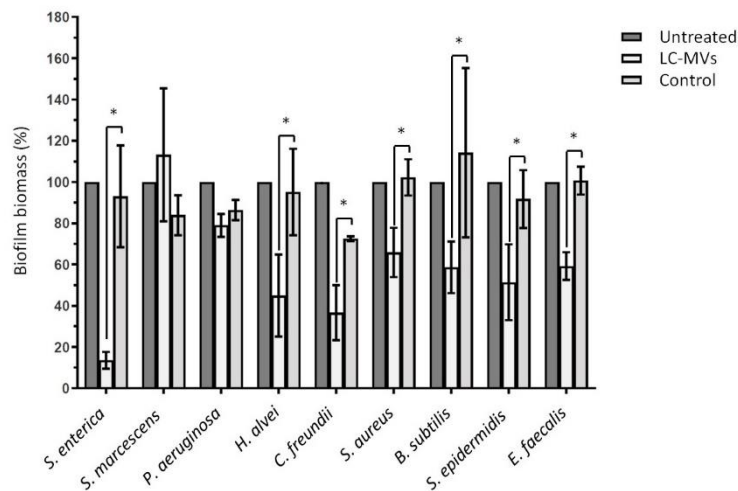
33. *Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation*. (Food and Agriculture Organization of the United Nations : World Health Organization, 2006).
34. Jones, R. M. Chapter 9 - The Use of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* in Clinical Trials for the Improvement of Human Health. in *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology* (eds. Floch, M. H., Ringel, Y. & Allan Walker, W.) 99–108 , doi:10.1016/B978-0-12-804024-9.00009-4 (Academic Press, 2017). doi:10.1016/B978-0-12-804024-9.00009-4.
35. Jacobsen, C. N. *et al.* Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by *in vitro* techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4949–4956 , doi:10.1128/AEM.65.11.4949-4956.1999 (1999).
36. Timmerman, H. M., Koning, C. J. M., Mulder, L., Rombouts, F. M. & Beynen, A. C. Monostrain, multistrain and multispecies probiotics--A comparison of functionality and efficacy. *Int. J. Food Microbiol.* **96**, 219–233 , doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.012 (2004).
37. Watterlot, L. *et al.* Intra-gastric administration of a superoxide dismutase-producing recombinant *Lactobacillus casei* BL23 strain attenuates DSS colitis in mice. *Int. J. Food Microbiol.* **144**, 35–41 , doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.037 (2010).
38. Rochat, T. *et al.* Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus casei* BL23 producing or not a manganese-dependant catalase on DSS-induced colitis in mice. *Microb. Cell Factories* **6**, 22 , doi:10.1186/1475-2859-6-22 (2007).
39. Archambaud, C. *et al.* Impact of lactobacilli on orally acquired listeriosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 16684–16689 , doi:10.1073/pnas.1212809109 (2012).
40. Souza, R. F. S. *et al.* *Lactobacillus casei* BL23 modulates the innate immune response in *Staphylococcus aureus*-stimulated bovine mammary epithelial cells. *Benef. Microbes* **9**, 985–995 , doi:10.3920/BM2018.0010 (2018).
41. Domínguez Rubio, A. P. *et al.* *Lactobacillus casei* BL23 produces microvesicles carrying proteins that have been associated with its probiotic effect. *Front. Microbiol.* **8**, 1783 , doi:10.3389/fmicb.2017.01783 (2017).
42. da Silva Barreira David *et al.* Spontaneous prophage induction contributes to the production of membrane vesicles by the Gram-positive bacterium *Lactobacillus casei* BL23. *mBio* , doi:10.1128/mbio.02375-22 (2022).
43. Schooling, S. R. & Beveridge, T. J. Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms. *J. Bacteriol.* **188**, 5945–5957 , doi:10.1128/JB.00257-06 (2006).
44. Yonezawa, H. *et al.* Outer membrane vesicles of *Helicobacter pylori* TK1402 are involved in biofilm formation. *BMC Microbiol.* **9**, 197 , doi:10.1186/1471-2180-9-197 (2009).
45. Grande, R. *et al.* *Helicobacter pylori* ATCC 43629/NCTC 11639 Outer Membrane Vesicles (OMVs) from biofilm and planktonic phase associated with extracellular DNA (eDNA). *Front. Microbiol.* **6**, , doi:10.3389/fmicb.2015.01369 (2015).
46. Liao, S. *et al.* *Streptococcus mutans* extracellular DNA is upregulated during growth in biofilms, actively released via membrane vesicles, and influenced by components of the protein secretion machinery. *J. Bacteriol.* **196**, 2355–2366 , doi:10.1128/JB.01493-14 (2014).
47. Wen, Z. T. *et al.* Multiple factors are involved in regulation of extracellular membrane vesicle biogenesis in *Streptococcus mutans*. *Mol. Oral Microbiol.* **36**, 12–24 , doi:10.1111/omi.12318 (2021).
48. Baumgarten, T. *et al.* Membrane vesicle formation as a multiple-stress response mechanism enhances *Pseudomonas putida* DOT-T1E cell surface hydrophobicity and biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 6217–6224 , doi:10.1128/AEM.01525-12 (2012).
49. Seike, S. *et al.* Outer membrane vesicles released from *Aeromonas* strains are involved in the biofilm formation. *Front. Microbiol.* **11**, 613650 , doi:10.3389/fmicb.2020.613650 (2021).
50. Lee, B.-H. *et al.* The applications of *Lactobacillus plantarum*-derived extracellular vesicles as a novel natural antibacterial agent for improving quality and safety in tuna fish. *Food Chem.* **340**, 128104 , doi:10.1016/j.foodchem.2020.128104 (2021).

51. Wang, Y. *et al.* Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilms with bacterial-derived outer membrane vesicles. *BMC Microbiol.* **21**, 234 , doi:10.1186/s12866-021-02296-x (2021).
52. Esoda, C. N. & Kuehn, M. J. *Pseudomonas aeruginosa* leucine aminopeptidase influences early biofilm composition and structure via vesicle-associated antibiofilm activity. *mBio* **10**, e02548-19 , doi:10.1128/mBio.02548-19 (2019).
53. Deatherage, B. L. & Cookson, B. T. Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life. *Infect. Immun.* **80**, 1948–1957 , doi:10.1128/IAI.06014-11 (2012).
54. Kim, J. H., Lee, J., Park, J. & Ghoo, Y. S. Gram-negative and Gram-positive bacterial extracellular vesicles. *Semin. Cell Dev. Biol.* **40**, 97–104 , doi:10.1016/j.semcdb.2015.02.006 (2015).
55. Brown, L., Wolf, J. M., Prados-Rosales, R. & Casadevall, A. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 620–630 , doi:10.1038/nrmicro3480 (2015).
56. Toyofuku, M., Nomura, N. & Eberl, L. Types and origins of bacterial membrane vesicles. *Nat. Rev. Microbiol.* **17**, 13–24 , doi:10.1038/s41579-018-0112-2 (2018).
57. Jeyanathan, A. *et al.* LACTOBACILLUS cell-free supernatant as a novel bioagent and biosurfactant against *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* in the prevention and treatment of orthopedic implant infection. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **109**, 1634–1643 , doi:10.1002/jbm.b.34821 (2021).
58. Wilson, R. M., Walker, J. M. & Yin, K. Different Concentrations of *Lactobacillus acidophilus* cell free filtrate have differing anti-biofilm and immunomodulatory effects. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **11**, 737392 , doi:10.3389/fcimb.2021.737392 (2021).
59. Schwechheimer, C. & Kuehn, M. J. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 605–619 , doi:10.1038/nrmicro3525 (2015).
60. Beveridge, T. J., Makin, S. A., Kadurugamuwa, J. L. & Li, Z. Interactions between biofilms and the environment. *FEMS Microbiol. Rev.* **20**, 291–303 , doi:10.1111/j.1574-6976.1997.tb00315.x (1997).
61. Toyofuku, M., Roschitzki, B., Riedel, K. & Eberl, L. Identification of Proteins Associated with the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Extracellular Matrix. *J. Proteome Res.* **11**, 4906–4915 , doi:10.1021/pr300395j (2012).
62. Marsollier, L. *et al.* Impact of *Mycobacterium ulcerans* biofilm on transmissibility to ecological niches and buruli ulcer pathogenesis. *PLoS Pathog.* **3**, e62 , doi:10.1371/journal.ppat.0030062 (2007).
63. Palsdottir, H. *et al.* Three-dimensional macromolecular organization of cryofixed *Myxococcus xanthus* biofilms as revealed by electron microscopic tomography. *J. Bacteriol.* **191**, 2077–2082 , doi:10.1128/JB.01333-08 (2009).
64. Remis, J. P. *et al.* Bacterial social networks: structure and composition of *Myxococcus xanthus* outer membrane vesicle chains: membrane vesicle chains and membrane network of *M. xanthus*. *Environ. Microbiol.* **16**, 598–610 , doi:10.1111/1462-2920.12187 (2014).
65. Mozaheb, N. *et al.* Contribution of membrane vesicle to reprogramming of bacterial membrane fluidity in *Pseudomonas aeruginosa*. *mSphere* **7**, e00187-22 , doi:10.1128/msphere.00187-22 (2022).
66. Morinaga, K., Yamamoto, T., Nomura, N. & Toyofuku, M. *Paracoccus denitrificans* can utilize various long-chain *N*-acyl homoserine lactones and sequester them in membrane vesicles: Sequestering QS signals in MVs. *Environ. Microbiol. Rep.* **10**, 651–654 , doi:10.1111/1758-2229.12674 (2018).
67. Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P. & Foster, S. Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 259–286 , doi:10.1111/j.1574-6976.2007.00099.x (2008).
68. Turnbull, L. *et al.* Explosive cell lysis as a mechanism for the biogenesis of bacterial membrane vesicles and biofilms. *Nat. Commun.* **7**, 11220 , doi:10.1038/ncomms11220 (2016).
69. Toyofuku, M. *et al.* Prophage-triggered membrane vesicle formation through peptidoglycan damage in *Bacillus subtilis*. *Nat. Commun.* **8**, 481 , doi:10.1038/s41467-017-00492-w (2017).

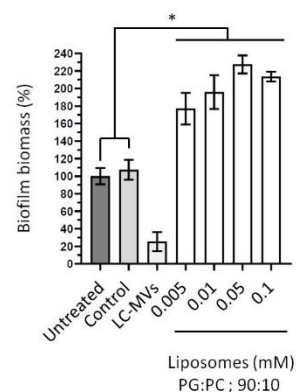
70. Liu, Y. *et al.* Extracellular vesicle formation in *Lactococcus lactis* is stimulated by prophage-encoded holin–lysin system. *Microb. Biotechnol.* **15**, 1281–1295 , doi:10.1111/1751-7915.13972 (2022).
71. Abe, K., Toyofuku, M., Nomura, N. & Obana, N. Autolysis-mediated membrane vesicle formation in *Bacillus subtilis*. *Environ. Microbiol.* **23**, 2632–2647 , doi:10.1111/1462-2920.15502 (2021).
72. Oliveira, H. *et al.* A Thermostable *Salmonella* phage endolysin, Lys68, with broad bactericidal properties against Gram-negative pathogens in presence of weak acids. *PLoS ONE* **9**, e108376 , doi:10.1371/journal.pone.0108376 (2014).
73. Sass, P. & Bierbaum, G. Lytic activity of recombinant bacteriophage  $\phi$ 11 and  $\phi$ 12 endolysins on whole cells and biofilms of *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 347–352 , doi:10.1128/AEM.01616-06 (2007).
74. Son, J.-S. *et al.* Antibacterial and biofilm removal activity of a podoviridae *Staphylococcus aureus* bacteriophage SAP-2 and a derived recombinant cell-wall-degrading enzyme. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **86**, 1439–1449 , doi:10.1007/s00253-009-2386-9 (2010).
75. Gutiérrez, D., Ruas-Madiedo, P., Martínez, B., Rodríguez, A. & García, P. Effective removal of staphylococcal biofilms by the endolysin LysH5. *PLoS One* **9**, e107307 , doi:10.1371/journal.pone.0107307 (2014).
76. Fenton, M. *et al.* Bacteriophage-derived peptidase CHAPK eliminates and prevents staphylococcal biofilms. *Int. J. Microbiol.* **2013**, 625341 , doi:10.1155/2013/625341 (2013).
77. Yang, H., Zhang, Y., Huang, Y., Yu, J. & Wei, H. Degradation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms using a chimeric lysin. *Biofouling* **30**, 667–674 , doi:10.1080/08927014.2014.905927 (2014).
78. Ceotto-Vigoder, H. *et al.* Nisin and lysostaphin activity against preformed biofilm of *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis. *J. Appl. Microbiol.* **121**, 101–114 , doi:10.1111/jam.13136 (2016).
79. Kumar, A., Khan, I. A., Sharma, P. R., K, S. & Ella, K. M. Evaluation of activity of recombinant lysostaphin against isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Indian hospitals. *J. Med. Microbiol.* **63**, 763–766 , doi:10.1099/jmm.0.070557-0 (2014).
80. Yeroslavsky, G., Girshevitz, O., Foster-Frey, J., Donovan, D. M. & Rahimpour, S. Antibacterial and antibiofilm surfaces through polydopamine-assisted immobilization of lysostaphin as an antibacterial enzyme. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* **31**, 1064–1073 , doi:10.1021/la503911m (2015).
81. Hukić, M. *et al.* The effect of lysozyme on reducing biofilms by *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Gardnerella vaginalis*: an *in vitro* examination. *Microb. Drug Resist. Larchmt. N* **24**, 353–358 , doi:10.1089/mdr.2016.0303 (2018).
82. Bäuerl, C., Pérez-Martínez, G., Yan, F., Polk, D. B. & Monedero, V. Functional analysis of the p40 and p75 proteins from *Lactobacillus casei* BL23. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 231–241 , doi:10.1159/000322233 (2010).
83. Bäuerl, C. *et al.* P40 and P75 are singular functional muramidases present in the *Lactobacillus casei* /*paracasei*/*rhamnosus* taxon. *Front. Microbiol.* **10**, 1420 , doi:10.3389/fmicb.2019.01420 (2019).
84. Bäuerl, C., Coll-Marqués, J. M., Tarazona-González, C. & Pérez-Martínez, G. *Lactobacillus casei* extracellular vesicles stimulate EGFR pathway likely due to the presence of proteins P40 and P75 bound to their surface. *Sci. Rep.* **10**, 19237 , doi:10.1038/s41598-020-75930-9 (2020).
85. Leloup, L., Ehrlich, S. D., Zagorec, M. & Morel-Deville, F. Single-crossover integration in the *Lactobacillus sake* chromosome and insertional inactivation of the *ptsI* and *lacl* genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2117–2123 , doi:10.1128/aem.63.6.2117-2123.1997 (1997).
86. Rico, J., Yebra, M. J., Pérez-Martínez, G., Deutscher, J. & Monedero, V. Analysis of *ldh* genes in *Lactobacillus casei* BL23: role on lactic acid production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 579–586 , doi:10.1007/s10295-008-0319-8 (2008).

87. Posno, M. *et al.* Incompatibility of *Lactobacillus* vectors with replicons derived from small cryptic *Lactobacillus* plasmids and segregational instability of the introduced vectors. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1822–1828 , doi:10.1128/aem.57.6.1822-1828.1991 (1991).
88. Casabona, M. G., Vandenbrouck, Y., Attree, I. & Couté, Y. Proteomic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 inner membrane. *Proteomics* **13**, 2419–2423 , doi:10.1002/pmic.201200565 (2013).
89. Vallenet, D. *et al.* MicroScope: an integrated platform for the annotation and exploration of microbial gene functions through genomic, pangenomic and metabolic comparative analysis. *Nucleic Acids Res.* **48**, D579–D589 , doi:10.1093/nar/gkz926 (2020).
90. Bouyssié, D. *et al.* Proline: an efficient and user-friendly software suite for large-scale proteomics. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **36**, 3148–3155 , doi:10.1093/bioinformatics/btaa118 (2020).
91. Couté, Y., Bruley, C. & Burger, T. Beyond target-decoy competition: stable validation of peptide and protein identifications in mass spectrometry-based discovery proteomics. *Anal. Chem.* **92**, 14898–14906 , doi:10.1021/acs.analchem.0c00328 (2020).
92. Perez-Riverol, Y. *et al.* The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data. *Nucleic Acids Res.* **47**, D442–D450 , doi:10.1093/nar/gky1106 (2019).
93. Wiczorek, S. *et al.* DAPAR & ProStaR: software to perform statistical analyses in quantitative discovery proteomics. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **33**, 135–136 , doi:10.1093/bioinformatics/btw580 (2017).
94. Schwanhäusser, B. *et al.* Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* **473**, 337–342 , doi:10.1038/nature10098 (2011).
95. Regulski, K. *et al.* Analysis of the peptidoglycan hydrolase complement of *Lactobacillus casei* and characterization of the major  $\gamma$ -D-Glutamyl-L-Lysyl-endopeptidase. *PLoS ONE* **7**, e32301 , doi:10.1371/journal.pone.0032301 (2012).

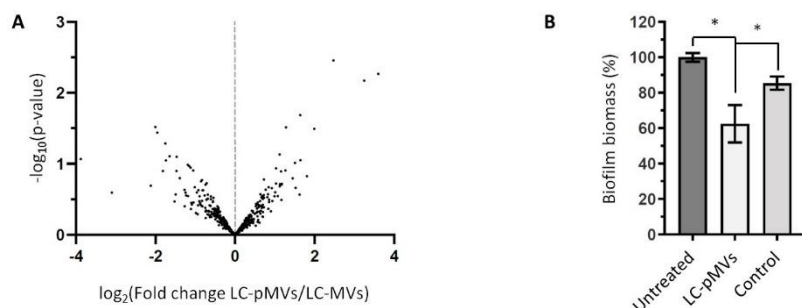
## Supplemental Material



**Fig. S1** MVs released by *L. casei* BL23 (LC-MVs) exhibit antibiofilm activities against a wide range of pathogenic bacteria. Bacteria were grown in polystyrene microplates and treated with LC-MVs (0.04  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) or a control fraction. The control corresponds to the fraction collected after carrying out the purification protocol on the culture medium alone (i.e. MRS medium). After 24 hours of culture, biofilms were quantified by crystal violet staining. Results were normalized to the untreated conditions and expressed as a percentage.



**Fig. S2** Liposomes of similar lipid composition to LC-MVs promote *S. Enteritidis* biofilm development. *S. Enteritidis* was cultured for 24 hours with increasing concentration of Liposomes (PG/PC; 90:10 | Ref: CPG-501). Biofilm biomasses were then quantified by crystal violet staining.



**Fig. S3** No significant difference in protein abundance was obtained before and after purification of the LC-MVs by density gradient purification. (A) Volcano plot comparing the relative abundance of proteins identified in the vesicles obtained with the standard purification protocol (LC-MVs) to the proteins identified in the vesicles after density gradient purification (LC-pMVVs). Red dots represent proteins with p-value < 0.01. Black dots correspond to non-significant change between conditions. (B) *S. Enteritidis* were cultured with vesicles (0.004  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) obtain after density gradient purification (LC-pMVVs) or a control fraction (Control). After 24 hours of culture, biofilms were quantified by crystal violet staining as described previously.

## TABLES

**Table S1.** MS-based label-free quantitative proteomic analysis of three independent preparations of *L. casei* BL23 MVs before (LC-MVs) and after (LC-pMVVs) density gradient purification.

**Table S2.** Strains, plasmids and oligonucleotides used in this study.

Strains	Relevant characteristic or description	Resistance(s)	Source or reference
<i>Escherichia coli</i>			
DH5 $\alpha$	<i>F-</i> $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA_argF</i> ) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> ( <i>r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup></i> ) <i>phoA supE44 thi_1 gyrA96 relA1</i> $\lambda^-$		1
<i>Lactocaseibacillus casei</i>			
BL23	Laboratory strains; sequenced genome		CECT 5275
DDB003	BL23 (LCABL_02770)::pRV003	Ery <sup>r</sup>	This work
DDB004	BL23 <i>sp</i> (LCABL_21960)::pRV004	Ery <sup>r</sup>	This work
DDB005	BL23 (LCABL_00230)::pRV005	Ery <sup>r</sup>	This work
DDB006	BL23 <i>isI</i> A(LCABL_02350)::pRV006	Ery <sup>r</sup>	This work
DDB007	BL23 <i>ami</i> (LCABL_17510)::pRV007	Ery <sup>r</sup>	This work
DDB008	BL23 <i>dacA</i> (LCABL_02100)::pRV008	Ery <sup>r</sup>	This work
DDB009	BL23 <i>pbpX2</i> (LCABL_20230)::pRV009	Ery <sup>r</sup>	This work
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> Serovar Enteritidis			CIP 81.3
<i>Serratia marscescens</i>			CIP 58.14
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			CIP A22



<i>Hafnia alvei</i>			CIP 57.31
<i>Citrobacter freundii</i>			CIP 57.32
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>			CIP 53.156
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>			CIP 52.65
<i>Staphylococcus</i> <i>epidermidis</i>			CIP 53.124
<i>Enterococcus faecalis</i>			CIP 76.117

Plasmids	Relevant characteristic or description	Resistance(s)	Source or reference
pRV300	Insertional vector for lactobacilli	Amp <sup>r</sup> , Ery <sup>r</sup>	<sup>2</sup>
pRV003	pRV300 with a 692 bp fragment of the gene LCABL_02770 cloned at HindIII/ EcoRI sites	Amp <sup>r</sup> , Ery <sup>r</sup>	This work
pRV004	pRV300 with a 518 bp fragment of the gene LCABL_21960 cloned at HindIII/SacI sites	Amp <sup>r</sup> , Ery <sup>r</sup>	This work
pRV005	pRV300 with a 631 bp fragment of the gene LCABL_00230 cloned at HindIII/SacI sites	Amp <sup>r</sup> , Ery <sup>r</sup>	This work
pRV006	pRV300 with a 1070 bp fragment of the gene LCABL_02350 cloned at HindIII/SacI sites	Amp <sup>r</sup> , Ery <sup>r</sup>	This work
pRV007	pRV300 with a 517 bp fragment of the gene LCABL_17510 cloned at HindIII/EcoRI sites	Amp <sup>r</sup> , Ery <sup>r</sup>	This work
pRV008	pRV300 with a 637 bp fragment of the gene LCABL_02100 cloned at HindIII/EcoRI sites	Amp <sup>r</sup> , Ery <sup>r</sup>	This work
pRV009	pRV300 with a 444 bp fragment of the gene LCABL_20230 cloned at EcoRI site	Amp <sup>r</sup> , Ery <sup>r</sup>	This work

Ery<sup>r</sup>, erythromycin resistant; Amp<sup>r</sup>, ampicillin resistant; CECT, Colección Española de Cultivos Tipo; CIP, Collection de l'Institut Pasteur.

Oligonucleotides	Sequence (5' _3')
Construction of pRV003, pRV004, pRV005, pRV006, pRV007, pRV008, pRV009	
P003_FD	GGTATTAAGCTTCAGGATTCGTTGGTGCTGC
P003_RV	GGTATTGAATTCGAAGCGCGGCATTTGAAGC
P004_FD	GGTACTGAGCTCCAACGGCTCTTTGTCGCAAC
P004_RV	GATACGAAGCTTTTGGCTGGGGTTGGGGTTTC
P005_FD	GCACACAAGCTTCCAACAAAAGCGAAACCAATGC
P005_RV	CGTATTGAGCTCCGCAACGGTCTTCAAAGC
P006_FD	CGTATTGAGCTCTGACGCCTTTACCCGAACATAC
P006_RV	GGAGTTAAGCTTGGCAAGGGCAACGAGTCTATG
P007_FD	GTTGATAAGCTTCGTGCGGTTAGGTCTGGTTTG
P007_RV	CAGATTGAATTCGTCAGTTCGGTGCCTTTGTC
P008_FD	GGTATTAAGCTTCGCCAGCAATGTCCGATATCTG
P008_RV	GGTATTGAATTCTCGCATCACTGGTTCCCTTACG
P009_FD	GGTATTGAATTCCTTACGCAAACCTAAAGCCGCTG

P009_RV	GGTATTGAATTCCGATCCGCCGTGAATACGAAG
---------	-----------------------------------

FD, forward; RV, reverse

#### REFERENCES

1. Taylor, R. G., Walker, D. C. & McInnes, R. R. E. coli host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucleic Acids Res.* **21**, 1677–1678 (1993).
2. Leloup, L., Ehrlich, S. D., Zagorec, M. & Morel-Deville, F. Single-crossover integration in the *Lactobacillus sake* chromosome and insertional inactivation of the *ptsI* and *lacI* genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2117–2123 , doi:10.1128/aem.63.6.2117-2123.1997 (1997).

## 2. Travaux complémentaires de l'article 2

### 2.1 Introduction

Les travaux présentés dans l'article 2 ont permis de montrer que les MVs produites par *L. casei* BL23 présentent une forte activité antibiofilm contre plusieurs bactéries pathogènes et bactéries d'altérations. Nous avons également démontré que l'activité des fractions vésiculaires de *L. casei* BL23 dépend de leur contenu protéique. Notamment, les hydrolases du peptidoglycane (PGHs) LCABL\_21960 et LCABL\_00230 ont été associées à l'effet antibiofilm observé contre *S. Enteritidis*. Toutefois, les mécanismes mis en jeu dans la contribution de ces deux PGHs restent encore à identifier. Dans cette partie du travail, nous avons souhaité déterminer si le traitement de *S. Enteritidis* par les PHGs (LCABL\_21960 et LCABL\_00230) purifiées impacte la formation du biofilm de *S. Enteritidis*. De plus, nous avons également souhaité caractériser les souches de *L. casei* BL23 obtenues dans l'article 2 (souches DDB003 à DDB009) correspondant aux souches mutées pour les gènes codant des PGHs. L'impact de ces mutations sur la croissance, la formation de biofilms et le profil protéique des vésicules de *L. casei* BL23 a été analysé.

### 2.2 Matériels et méthodes

#### Souches bactériennes et conditions de croissance

Les souches bactériennes et les plasmides utilisés dans cette partie sont présentés dans le Tableau 11A-B (Souches ; Plasmides). Sauf indication contraire, les conditions de culture des souches de *L. casei* et *Escherichia coli* DH5a sont identiques à celles présentées dans le chapitre 1, partie « II.1.2 Matériels et méthodes ».

La souche *Escherichia coli* BL21 (DE3) est utilisée pour l'expression des protéines recombinantes de *L. casei* BL23 et est cultivée dans un milieu LB liquide à 37 °C sous agitation. Les bactéries *Escherichia coli* BL21 (DE3) transformées avec les plasmides recombinants sont sélectionnées en milieu LB solide (1,5 % d'agar) avec 50 µg/mL de kanamycine.

#### Suivi de croissance

Les souches de *L. casei* sont inoculées dans des microplaques de 96 puits à une densité optique de 0,05 mesurée à une longueur d'onde de 600 nm (OD<sub>600nm</sub>). Les plaques sont ensuite scellées avec un film adhésif (Biorad) et la OD<sub>600nm</sub> est mesurée toutes les 2 h durant 24 h, à 37 °C sans agitation à l'aide d'un lecteur de plaque (Tecan Infinite 200 PRO).

#### Construction des plasmides et des souches mutantes

La construction des mutants d'insertion de *L. casei* BL23 est adaptée de la stratégie de mutagène publiée par de Leloup *et al.* (1997) et Muñoz-Provencio *et al.* (2012). Les souches mutantes DDB009, DDB004, DDB005, DDB006, DDB008, DDB003 et DDB007 sont obtenues par insertion de plasmides (pRV003, pRV004, pRV005, pRV006, pRV007, pRV008, pRV009) comme expliqué dans l'article 2.

Le gène *lcabl\_00230* est amplifié par PCR (Q5 High-Fidelity DNA polymerase NEB) en utilisant le génome de *L. casei* BL23 comme matrice. Les fragments amplifiés sont ensuite clonés dans le vecteur d'expression pET28a au niveau des sites de restriction NdeI/SacI. Le plasmide recombinant pET-28a-LCABL\_00230 contient ainsi la protéine LCABL\_00230 de *L. casei* BL23 en phase avec un tag histidine et est sous le contrôle du promoteur inductible T7. Le plasmide est ensuite transformé dans *Escherichia coli* BL21 (DE3) en suivant les instructions du fournisseur (Invitrogen ; C6010-03). Les bactéries transformantes (BL21 (DE3)\_LCABL\_00230) sont sélectionnées en milieu LB supplémenté

avec 50 µg/mL de kanamycine. L'intégration correcte du gène dans les plasmides est validée par séquençage.

Les amorces et le détail de la construction des plasmides sont présentés dans le tableau 11B-C (Plasmides ; Oligonucléotides-Construction des plasmides).

### **Expression de protéine recombinante et purification**

La protéine LCABL\_00230 portant un tag histidine est purifiée à partir des bactéries BL21 (DE3)\_LCABL\_00230. Pour la purification des protéines, les bactéries recombinantes sont tout d'abord inoculées dans 500 ml de LB liquide avec 30 µg/ml de kanamycine et incubées à 37 °C sous agitation jusqu'à ce que la densité optique atteigne 600 nm. Ensuite, l'expression des protéines recombinantes est induite en ajoutant 1mM d'IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) pendant 3 h à 37 °C sous agitation. Les cellules sont ensuite culotées par centrifugation (4000 rpm, 4 °C, pendant 10 min), lavées avec de l'eau physiologique à 4 °C, et remises en suspension dans du tampon de lyse (Native Binding Buffer ; K950-01). Puis, les protéines sont purifiées en conditions non dénaturantes avec le kit Ni-NTA Purification System (NOVEX ; K950-01) selon les instructions du fournisseur. Enfin, les protéines recueillies dans les solutions d'élutions sont concentrées et dialysées dans du tampon Tris-HCl (30 mM, pH 6.8) par ultrafiltration (Millipore ; Amicon Ultra-15 30 KDa).

### **Electrophorèse SDS-PAGE et immunoempreinte (Western Blot)**

Les extraits protéiques sont séparés par électrophorèse SDS-PAGE (électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium) puis électrotransférés sur une membrane en PVDF (Polyfluorure de vinylidène) (Bio-Rad) avec un système TransBlot Turbo (Bio-Rad). Les membranes sont ensuite incubées 1 h dans du lait 5 %, afin de bloquer les sites aspécifiques de la membrane. Après un lavage de 10 min, les membranes sont incubées 1 h avec des anticorps anti-histidine (ThermoFisher ; ref. MA1-21315) dilués au 3000<sup>e</sup> dans du lait 5 %. Les membranes sont lavées et après 1 h d'incubation avec des anticorps anti-souris couplés à la peroxydase de raifort (dilués au 3000<sup>e</sup> dans du lait) (IgG-HRP ; Biorad), les protéines recombinantes sont détectées à l'aide du kit ECL chimioluminescent (Biorad). La lumière émise par les anticorps secondaires est détectée avec l'imageur Odyssey Fc (LI-COR).

### **Frottis et coloration de Gram**

Une goutte de culture bactérienne liquide est déposée sur des lames de silice qui sont laissées sécher lentement à l'air libre. Les bactéries sont ensuite fixées sur les lames par un passage rapide à la flamme. Puis, les lames de frottis sont plongées 1 min dans du violet de gentiane avant d'être rincées à l'eau distillée. Les lames sont plongées 30 secondes dans du lugol puis sont rincées une nouvelle fois à l'eau distillée. Ensuite, les bactéries sont décolorées à l'alcool (95 %) et rincées une nouvelle fois à l'eau distillée. Enfin, les lames sont plongées dans de la fuschine pendant 30 secondes, rincées à l'eau distillée et séchées avant observation au microscope optique.

### **Analyse statistique**

Les résultats sont calculés à partir d'un minimum de 3 répétitions biologiques. Une ANOVA univariée et le test de comparaison multiple de Tukey sont utilisés. Les barres d'erreur représentent l'écart-type (SD) avec le symbole d'astérisque \* indiquant que les p-values sont inférieures à 0,05. Les p-values inférieures à 0,05 sont considérées comme significatives.

**Tableau 11 Souches (A), plasmides (B) et oligonucléotides (C) utilisés dans cette étude.**

(A)

Souches	Caractéristiques	Résistance(s)	Source ou référence
<i>Escherichia coli</i>			
DH5 $\alpha$	F- $\Phi$ 80/ <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA_argF</i> ) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) <i>phoA supE44 thi_1 gyrA96 relA1</i> $\lambda$ <sup>-</sup>		(Anton and Raleigh, 2016)
BL21(DE3)	F- <i>ompT hsdSB</i> (rB-mB-) <i>gal dcm rne131</i> (DE3)		(Jeong <i>et al.</i> , 2009)
BL21(DE3)_LCABL_00230	BL21(DE3) portant le plasmide pET-28a-LCABL_00230	Kan <sup>r</sup>	Cette étude
<i>Lactocaseibacillus casei</i>			
BL23	Souches de laboratoire ; génome séquencé		(Mazé <i>et al.</i> , 2010)
DDB003	BL23 ( <i>lcabl_02770</i> )::pRV003	Ery <sup>r</sup>	Cette étude
DDB004	BL23 <i>spl</i> ( <i>lcabl_21960</i> )::pRV004	Ery <sup>r</sup>	Cette étude
DDB005	BL23 ( <i>lcabl_00230</i> )::pRV005	Ery <sup>r</sup>	Cette étude
DDB006	BL23 <i>isIA</i> ( <i>lcabl_02350</i> )::pRV006	Ery <sup>r</sup>	Cette étude
DDB007	BL23 <i>ami</i> ( <i>lcabl_17510</i> )::pRV007	Ery <sup>r</sup>	Cette étude
DDB008	BL23 <i>dacA</i> ( <i>lcabl_02100</i> )::pRV008	Ery <sup>r</sup>	Cette étude
DDB009	BL23 <i>pbpX2</i> ( <i>lcabl_20230</i> )::pRV009	Ery <sup>r</sup>	Cette étude
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>			
WCFS-1	Souches de laboratoire ; génome séquencé		(Kleerebezem <i>et al.</i> , 2003, p. 1)
<i>Homo sapiens</i>			
THP-1 (TIB-202)	Lignée cellulaire de monocyte issue d'une leucémie monocyttaire aiguë		(Tsuchiya <i>et al.</i> , 1980)

(B)

Plasmides	Caractéristiques	Résistance(s)	Source ou référence
pRV300	Plasmide d'insertion de lactobacilles	Amp <sup>r</sup> , Ery <sup>r</sup>	(Leloup <i>et al.</i> , 1997)
pRV003	pRV300 contenant un fragment de 692 bp du gène <i>lcabl_02770</i> , cloné aux sites HindIII/EcoRI	Amp <sup>r</sup> , Ery <sup>r</sup>	Cette étude
pRV004	pRV300 contenant un fragment de 518 bp du gène <i>lcabl_21960</i> , cloné aux sites HindIII/SacI	Amp <sup>r</sup> , Ery <sup>r</sup>	Cette étude
pRV005	pRV300 contenant un fragment de 631 bp du gène <i>lcabl_00230</i> , cloné aux sites HindIII/SacI	Amp <sup>r</sup> , Ery <sup>r</sup>	Cette étude
pRV006	pRV300 contenant un fragment de 1070 bp du gène <i>lcabl_02350</i> , cloné aux sites HindIII/SacI	Amp <sup>r</sup> , Ery <sup>r</sup>	Cette étude
pRV007	pRV300 contenant un fragment de 517 bp du gène <i>lcabl_17510</i> , cloné aux sites HindIII/EcoRI	Amp <sup>r</sup> , Ery <sup>r</sup>	Cette étude

pRV008	pRV300 contenant un fragment de 637 bp du gène <i>lcabl_02100</i> , cloné aux sites HindIII/EcoRI	Amp <sup>r</sup> , Ery <sup>r</sup>	Cette étude
pRV009	pRV300 contenant un fragment de 444 bp du gène <i>lcabl_02230</i> , cloné au site EcoRI site	Amp <sup>r</sup> , Ery <sup>r</sup>	Cette étude
pET-28a	Plasmide d'expression d' <i>E. coli</i>	Kan <sup>r</sup>	Novagen
pET-28a-LCABL_00230	pET-28a contenant le gène <i>lcabl_00230</i> sous le contrôle du promoteur T7, cloné aux sites NdeI/SacI	Kan <sup>r</sup>	Cette étude

Ery<sup>r</sup>, érythromycine résistante ; Amp<sup>r</sup>, ampicilline résistante ; Kan<sup>r</sup>, kanamycine résistante.

(C)

Oligonucléotides	Séquence (5' _3')
Construction des plasmides pRV003, pRV004, pRV005, pRV006, pRV007, pRV008, pRV009	
P003_FD	GGTATTAAGCTTCAGGATTCGTTGGTGCTGC
P003_RV	GGTATTGAATTCGAAGCGGCGCATTGAAGC
P004_FD	GGTACTGAGCTCCAACGGCTCTTGTGCGCAAC
P004_RV	GATACGAAGCTTTTGGCTGGGGTTGGGGTTTC
P005_FD	GCACACAAGCTTCCAACAAAAGCGAAACCAATGC
P005_RV	CGTATTGAGCTCCGGCAACGGTCTTCAAAGC
P006_FD	CGTATTGAGCTCTGACGCCTTACCCGAACATAC
P006_RV	GGAGTTAAGCTTGGCAAGGCAACGAGTCTATG
P007_FD	GTTGATAAGCTTCGTGCGGTTAGGTCCTGGTTG
P007_RV	CAGATTGAATTCGTCAGTTCGGTGCCTTTGTC
P008_FD	GGTATTAAGCTTCGCCAGCAATGTCGGTATCTG
P008_RV	GGTATTGAATTCTCGCATCACTGGTTCCTTACG
P009_FD	GGTATTGAATTCCTTACGCAAATAAAGCCGCTG
P009_RV	GGTATTGAATTCGATCCGCCGTGAATACGAAG
Construction des plasmides pET-28a-LCABL_00230	
P_LCABL_00230_FD	CGCAGACATATGAAATTCAATAAAGTCATGATCAG
P_LCABL_00230_RV	GGTATTGAGCTCTTACCGGTGGATATAAACGTAAC

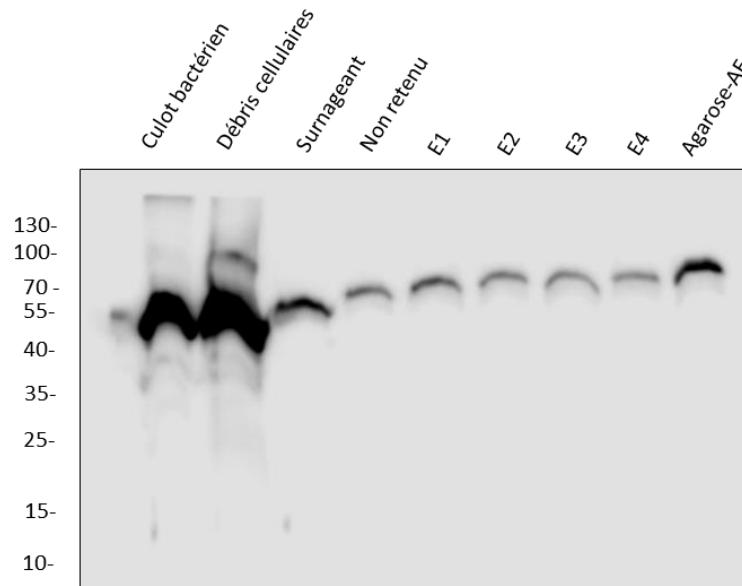
FD, forward; RV, reverse

## 2.3 Résultats – Discussion

### 2.3.1 Purification de l'hydrolase du peptidoglycane (LCABL\_00230) et activité antibiofilm

Dans cette partie, nous avons souhaité déterminer si les hydrolases du peptidoglycane (PGHs) LCABL\_21960 et LCABL\_00230 ont un effet sur la formation du biofilm de *S. Enteritidis*. Pour ce faire, les gènes *lcabl\_21960* et *lcabl\_00230* ont été clonés dans le plasmide pET28a et les protéines ont été surexprimées dans la souche *Escherichia coli* BL21 (DE3) comme expliqué dans la partie matériels et méthodes. Pour les deux constructions, l'induction des PGHs a eu un effet sur la viabilité cellulaire d'*Escherichia coli* BL21 (DE3). En effet, il est connu que l'activité de certaines hydrolases du peptidoglycane appelées autolysines peut induire la lyse cellulaire lorsque leur expression n'est pas régulée (Vollmer *et al.*, 2008). C'est pourquoi nous n'avons pas réussi à suffisamment induire la

protéine LCABL\_21960 dans la souche *Escherichia coli* BL21 (DE3) pour envisager une purification. À l'inverse, la purification de la protéine LCABL\_00230 a été réalisée à plusieurs reprises par Christine Bäuerl *et al.* (2019) (Bäuerl *et al.*, 2019, 2010, p. 23). De même, nous avons également pu induire et purifier la protéine LCABL\_00230 à partir de la souche *Escherichia coli* BL21 (DE3) transformée avec le plasmide pET28a-lcabl\_00230 (Tableau 11A-B). La présence de la protéine LCABL\_00230 au cours des étapes de purification est présentée dans la figure 43.



Anticorps anti-histidine (réf. MA1-21315), dilué au 3000<sup>e</sup> dans du lait

Fig. 43 Vérification par Immunoempreinte (ou Western blot) de la présence de la protéine LCABL\_00230 au cours des étapes de purification par Agarose Ni-NTA. La purification a été réalisée en utilisant la souche *Escherichia coli* BL21 (DE3) exprimant la protéine LCABL\_00230 de *L. casei* BL23 portant un tag histidine. Les échantillons analysés sont : « Culot bactérien », culot de bactéries entières d'*Escherichia coli* BL21 (DE3) exprimant LCABL\_00230 obtenues après 3 h d'induction avec 1mM IPTG ; « Débris cellulaires », culot de débris cellulaires obtenu après centrifugation du lysat du « Culot bactérien » ; « Surnageant », surnageant avant passage sur colonne, obtenu après centrifugation du lysat du culot bactérien ; « Non retenu », surnageant après passage sur colonne ; E1 à E4, correspond aux 4 solutions de 2 mL recueillies lors de l'étape d'élution ; « Agarose-AE », billes d'agarose après élution et lavage. 10  $\mu$ L de chaque échantillon ont été déposés sur un gel d'acrylamide SDS-PAGE 12 %. Les standards de poids moléculaire sont indiqués à gauche (kDa).

Nous pouvons observer que les solutions d'élutions E1 à E4 contiennent la protéine purifiée LCABL\_00230. Toutefois, toutes les protéines n'ont pas été éluées et une partie d'entre elles sont restées adhérees à l'agarose (Agarose-AE). Notons que les solutions d'élutions ont été dialysées et l'Agarose-AE a été lavée avec du tampon Tris-HCl (30 mM, pH 6.8). De plus, la quantité de protéines présente dans les échantillons a été déterminée par dosage de Bradford. En parallèle de la purification de LCABL\_00230, nous avons également réalisé le protocole de purification sur un culot d'*Escherichia coli* BL21 (DE3) transformé par un plasmide pET28a vide, et nous avons recueilli des fractions d'élutions équivalente aux fractions E1 à E4 ainsi que de l'Agarose-AE comme conditions contrôles.

L'effet des solutions d'élutions (E1-E4) et des solutions d'agarose sur la formation de biofilms par *S. Enteritidis* a ensuite été mesuré en plaque de 96 puits comme décrit dans l'article 2 (Fig. 44). Nous avons également souhaité tester l'activité de l'Agarose-AE étant donné que des protéines LCABL\_00230 sont restées adhérees à l'agarose.

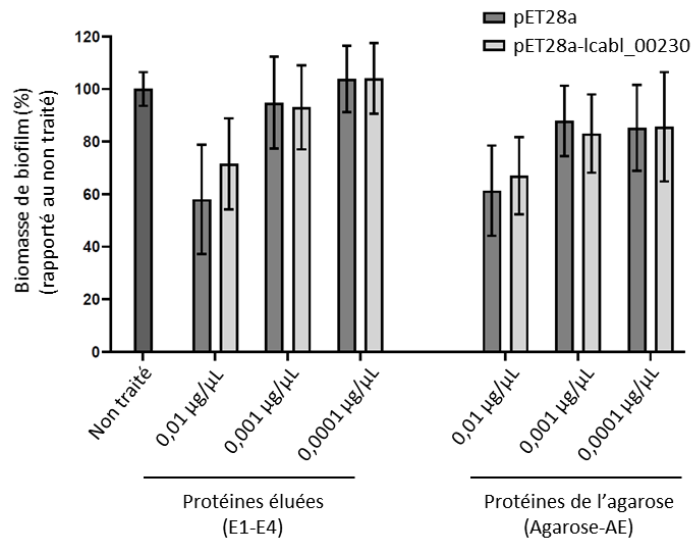


Fig. 44 Effets de la protéine LCABL\_00230 sur la formation de biofilm par *S. Enteritidis*. Les bactéries *S. Enteritidis* ont été cultivées dans des microplaques de polystyrène en présence de concentrations croissantes de protéines LCABL\_00230 purifiées et d'Agarose-AE (cf. Fig. 43). Après 24 h de culture, les biomasses de biofilms formées par *S. Enteritidis* ont été quantifiées par coloration au cristal violet. Les résultats ont été normalisés à la condition non traitée et sont exprimés en pourcentage.

La figure 44 permet d'observer que les protéines éluées et les protéines associées à l'agarose ont un effet antibiofilm dose dépendant sur *S. Enteritidis*. Toutefois, la présence de la protéine LCABL\_00230 dans les solutions n'augmente pas l'activité antibiofilm. Ces résultats suggèrent ainsi que la protéine purifiée LCABL\_00230 n'a pas d'effet sur la formation du biofilm par *S. Enteritidis*. Toutefois, cette absence d'effet ne permet pas d'exclure que la protéine purifiée LCABL\_00230 puisse avoir une activité antibiofilm contre *S. Enteritidis* lorsqu'elle est présente dans les vésicules de *L. casei* BL23. En effet, il est possible que son activité requière la participation d'autres protéines et/ou molécules présentes dans les vésicules. De plus, la présence du tag histidine peut modifier la structure tridimensionnelle de la protéine LCABL\_00230 et impacter son activité. Il est également possible que l'effet antibiofilm implique des régulations mettant en jeu une machinerie absente chez *Escherichia coli* (ex. modifications post traductionnelles, chaperonnes, etc.).

### 2.3.2 Caractérisation des mutants

Dans cette partie, nous avons souhaité caractériser les souches mutantes de *L. casei* BL23 obtenues dans l'article 2. Notamment, l'impact de la mutation des PGHs sur la croissance, la formation du biofilm et le profil protéique des vésicules libérées par les souches DDB003 à DDB009 ont été analysés (Fig. 45 et Fig. 46).



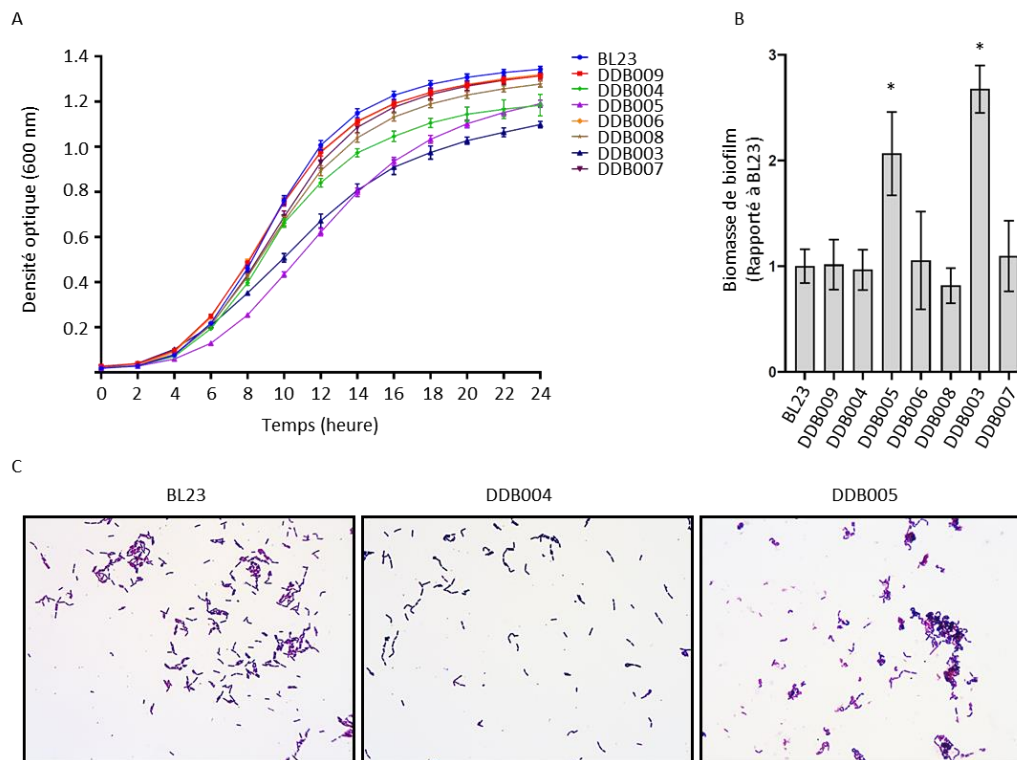


Fig. 45 Effets de la mutation des gènes codant pour les protéines les plus abondantes de la fraction vésiculaire de *L. casei* BL23 sur la croissance, la formation du biofilm et la morphologie des bactéries. (A) Courbe de croissance des souches mutantes et de la souche parentale (BL23). Les bactéries ont été cultivées en microplaque dans du milieu MRS, sans agitation à 37 °C, pendant 24 h. (B) La biomasse de biofilm formée par les souches mutantes et la souche parentale (BL23) a été quantifiée par coloration au cristal violet après 24 h de croissances dans les conditions décrites ci-dessus. Les résultats ont été normalisés à la condition BL23. (C) Observation en microscopie optique des souches mutantes de *L. casei* BL23 dont les MVs présentent une activité antibiofilm réduite contre *S. Enteritidis*. Les souches mutantes nommées DDB009, DDB004, DDB005, DDB006, DDB008, DDB003, DDB007 désignent des souches de *L. casei* portant le plasmide pRV300 intégré dans les gènes *lcabl\_20230*, *lcabl\_21960*, *lcabl\_00230*, *lcabl\_02350*, *lcabl\_02100*, *lcabl\_02770*, *lcabl\_17510*, respectivement.

Il est possible d'observer que l'impact des mutations sur la densité optique (600 nm) des souches mutantes à 24 h est très faible. Seules les souches DDB003, DDB004 et DDB005 sont affectées de manière notable, cependant l'impact des mutations reste modéré (Fig. 45A). Par ailleurs, il est intéressant de remarquer que ces 3 souches présentent des mutations dans des gènes codant pour les protéines majoritaires des fractions vésiculaires de *L. casei* BL23 (Article 2).

De plus, les souches DDB005 et DDB003 forment significativement plus de biofilms que la souche parentale après 24 h de croissance dans des conditions de culture standard (MRS, 37 °C, sans agitation) (Fig. 45B). Il est important de préciser que la biomasse de biofilm formée par la souche parentale BL23 dans des conditions de culture est très faible.

Les différences de croissance et de capacité à former des biofilms entre la souche parentale BL23 et les souches DDB005 et DDB003 pourraient en partie être expliquées par les conséquences morphologiques de la mutation des gènes codant pour les PGHs. En effet, les observations réalisées au microscope optique ont permis de mettre en évidence que certaines bactéries de la souche DDB005 s'agrègent en amas de cellules, ce qui pourrait ainsi favoriser la formation de biofilm et impacter la

croissance cellulaire (Fig. 45C). Les bactéries présentent néanmoins une morphologie similaire à celle de la souche parentale. De plus, il a été montré que la souche DDB003 forme de très longues chaînes de plus de 100  $\mu\text{m}$  en raison du rôle joué par la protéine LCABL\_02770 dans la séparation des bactéries lors de la division cellulaire (Bäuerl *et al.*, 2010, p. 23). La sédimentation de ces longs filaments pourrait ainsi expliquer l'augmentation de la biomasse de biofilm formée par la souche DDB003 en comparaison à la souche parentale (Fig. 45B). À l'inverse, la souche DDB004 présente une morphologie similaire à la souche parentale.

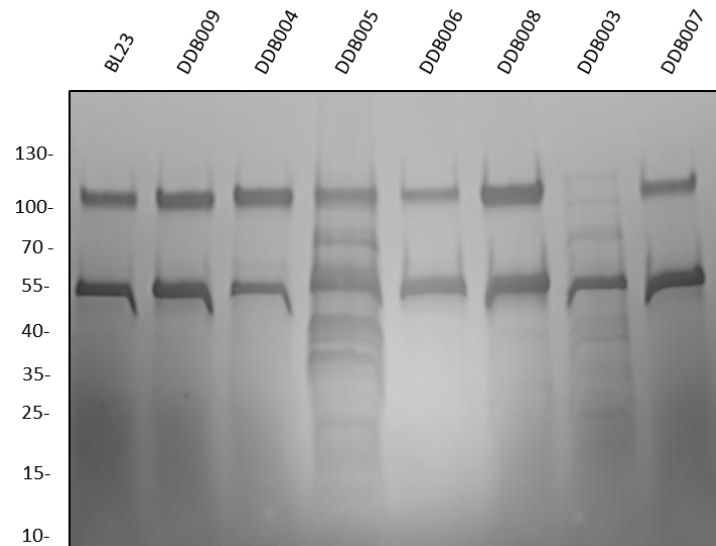


Fig. 46 Comparaison des profils protéiques des MVs des souches mutantes et de la souche parentale de *L. casei* par SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie. Les standards de poids moléculaire sont indiqués à gauche (kDa). Les souches mutantes nommées DDB009, DDB004, DDB005, DDB006, DDB008, DDB003, DDB007 désignent des souches de *L. casei* portant le plasmide pRV300 intégré dans les gènes *lcabl\_20230*, *lcabl\_21960*, *lcabl\_00230*, *lcabl\_02350*, *lcabl\_02100*, *lcabl\_02770*, *lcabl\_17510*, respectivement.

Le profil protéique des vésicules libérées par les différents mutants a été comparé par électrophorèse SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie. Seuls les profils protéiques des vésicules des souches DDB005 et DDB003 présentent des différences notables en comparaison au profil des vésicules de la souche parentale BL23. Notamment, on remarque à environ 100 kDa l'absence d'une bande dans le profil des MVs de DDB003 en comparaison au profil de BL23, suggérant ainsi que cette protéine correspond à la protéine LCABL\_02770. Dans le cadre d'expérimentation complémentaire, le profil du lysat cellulaire d'*Escherichia coli* BL23 (DE3) exprimant LCABL\_02770 nous a permis de confirmer que la taille de migration de cette protéine est effectivement d'environ 100 kDa malgré une taille théorique de 49,69 kDa. Enfin, nous pouvons observer que le profil protéique des vésicules de la souche DDB005 est très différent de celui de la souche parentale, ce qui pourrait ainsi expliquer la plus faible activité antibiofilm de ces vésicules. À l'inverse, la mutation du gène *lcabl\_21960* n'a pas d'impact notable sur la croissance et la morphologie de la souche DDB004 ainsi que sur le profil protéique des vésicules libérées. Ces observations suggèrent que contrairement à la protéine LCABL\_00230, la protéine LCABL\_21960 pourrait être directement impliquée dans l'activité antibiofilm des vésicules de *L. casei* BL23 contre *S. Enterica*.

## 2.4 Conclusions – perspectives

L'ensemble de ces résultats montre que la protéine LCABL\_00230 purifiée à partir de la souche *Escherichia coli* BL21 (DE3) ne présente pas d'activité antibiofilm supplémentaire en comparaison aux solutions contrôles. De plus, la purification de la protéine LCABL\_21960 à partir de la souche *Escherichia coli* BL21 (DE3) semble peu adaptée étant donné que son expression entraîne une forte lyse cellulaire. Enfin, la caractérisation morphologique des différentes souches mutantes de *L. casei* BL23 (DDB003 à DDB0009) suggère que les protéines LCABL\_21960 et LCABL\_00230 pourraient avoir une implication directe et indirecte sur l'activité antibiofilm des vésicules, respectivement.

Afin de déterminer plus précisément la contribution des protéines LCABL\_21960 et LCABL\_00230 dans l'effet antibiofilm des vésicules, il serait intéressant d'analyser la composition protéique des vésicules libérées par les souches DDB004 et DDB005. De plus, nous pourrions également étudier par immunofluorescence les mécanismes d'interaction des vésicules de *L. casei* BL23 avec *S. Enteritidis*, afin de savoir si les MVs interagissent directement avec les bactéries. Par exemple, il est possible que les vésicules libèrent leur contenu dans le préplasma des salmonelles. Les PHGs pourraient ainsi modifier le peptidoglycane et/ou impacter la signalisation cellulaire des salmonelles.

## 3. Activité immunomodulatrice des vésicules membranaires de *Lactocaseibacillus casei* BL23

### 3.1 Introduction

Plusieurs protéines aux effets probiotiques telles que GroEL et des hydrolases du PGNs (LCABL\_00230 et LCABL\_02770) ont pu être identifiées dans les fractions vésiculaires de *L. casei* BL23 par nos analyses protéomiques ainsi que par les travaux de Rubio *et al.* (2017). Notamment, Bäuerl *et al.* (2010) ont mis en évidence sur un modèle *ex vivo* (côlon de la souris), le rôle protecteur et anti-apoptotique de deux PGHs (LCABL\_00230 et LCABL\_02770) de *L. casei* BL23 (Bäuerl *et al.*, 2010). De même, les protéines GroEL exprimées par *L. paracasei* ATCC334 et *L. reuteri* ont été associées à des effets anti-inflammatoires bénéfiques sur des modèles *in vivo* (souris, poisson-zèbre) et des modèles cellulaires (THP-1) (Dias *et al.*, 2021; Rieu *et al.*, 2014). En particulier, les travaux du laboratoire ont démontré que la protéine GroEL de *L. paracasei* ATCC334 est impliquée dans la réduction de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ ) sur un modèle de macrophages dérivés de monocytes (THP-1) stimulés par du LPS. Ainsi, la présence de protéines aux activités probiotiques dans les vésicules de *L. casei* BL23 suggère que les vésicules puissent interagir avec les cellules de mammifères et avoir des rôles immunomodulateurs bénéfiques. Sur la base de ces observations, nous avons donc souhaité explorer le rôle immunomodulateur des MVs de *L. casei* BL23 sur un modèle de cellules THP-1 stimulées par du LPS.

### 3.2 Matériels et méthodes

#### Souches bactériennes et conditions de croissance

Les souches bactériennes et les plasmides utilisés dans cette partie sont présentés dans le tableau 11A-B (Souches ; Plasmides). Les bactéries *L. casei* BL23 et *L. plantarum* WCFS-1 sont cultivées en anaérobiose dans un milieu Man-Rogosa-Sharpe (MRS ; Conda) à 37 °C sans agitation pendant 24 h.

### **Purification des MVs**

Les vésicules de *L. casei* BL23 et *L. plantarum* WCFS-1 ont été purifiées en combinant des étapes de centrifugations différentielles, d'ultrafiltration et de séparation sur gradient de densité comme détaillé dans l'article de da Silva Barreira *et al.* (2022).

### **Culture cellulaire eucaryote et ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)**

Les cellules monocytaires humaines THP-1 (ATCC ; TIB-202) sont cultivées en milieu RPMI-1640 (Invitrogen) complété de 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) à 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> selon les recommandations de l'ATCC (American Type Culture Collection). Les THP-1 sont différenciées en macrophages avec 200 nM de Phorbol 12 -Myristate 13-Acetate (Sigma-Aldrich) pendant 24 h dans des plaques de polystyrène de 48 puits, à une densité de 5 × 10<sup>4</sup> cellules par puits. Après différenciation, les cellules sont lavées avec du PBS stérile puis incubées dans du RPMI-1640 avec 10 % SVF, à 37 °C et 5 % CO<sub>2</sub> pendant 30 min avec les fractions vésiculaires de lactobacilles. Ensuite, du LPS d'*Escherichia coli* O127:B8 (100 ng-ml<sup>-1</sup>) (Sigma-Aldrich) est ajouté aux cellules pour stimuler la production de la cytokine pro-inflammatoire TNF-α. Après 3 h d'incubation en présence ou en absence de LPS, les plaques sont centrifugées (1500 g, 5 min, 4 °C) et la quantité de TNF-α dans les surnageant est mesurée par ELISA (Bio-Legend, réf. 430201) en suivant les instructions du fournisseur.

### **Analyses statistiques**

Les résultats sont calculés à partir d'un minimum de 3 répétitions biologiques. Des tests de Mann-Whitney non appariés sont utilisés pour comparer les médianes des différentes conditions. Les barres d'erreur représentent l'écart-type (SD) avec le symbole d'astérisque \* indiquant que les p-values sont inférieures à 0,05. Les p-values inférieures à 0,05 sont considérées comme significatives.

## **3.3 Résultats – Discussion**

Dans cette partie, nous avons souhaité évaluer l'activité immunomodulatrice des MVs de *L. casei* BL23. Pour ce faire, des monocytes THP-1 différenciés en macrophages ont été traités avec des vésicules de *L. casei* BL23 avant d'être stimulés ou non par du LPS (Lipopolysaccharides). Les LPS sont des PAMPs reconnus par les récepteurs de l'immunité innée (TLR4) présents à la surface des THP-1 qui déclenchent une cascade de signalisation cellulaire aboutissant à la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF-α. La quantité de cytokines pro-inflammatoires TNF-α a été mesurée par ELISA comme expliqué dans le schéma figure 47A. L'effet des vésicules de *L. plantarum* WCFS-1 a également été mesuré afin de contrôler la validité du modèle THP-1 (Fig. 47B). En effet, l'activité anti-inflammatoire des vésicules de *L. plantarum* WCFS-1 a précédemment été montrée dans un modèle similaire de cellules THP-1 stimulées par du LPS (Kuhn *et al.*, 2020). La concentration protéique des fractions vésiculaires a été mesurée par dosage de Bradford et l'activité de deux quantités protéiques de vésicules (0,005 et 0,0025 µg/µL) a été évaluée.

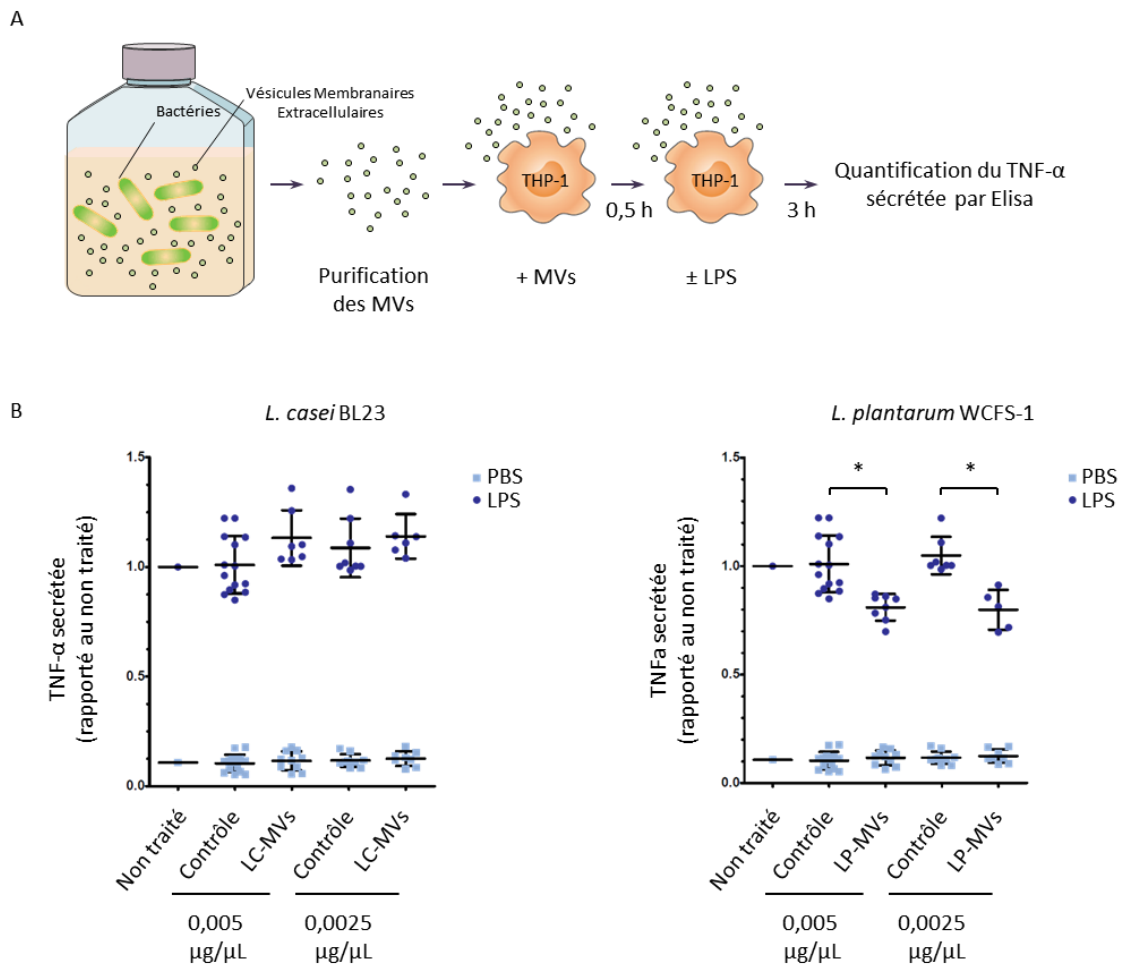


Fig. 47 Effet des MVs de *L. casei* BL23 sur la sécrétion de TNF- $\alpha$  par des macrophages dérivés de monocytes (THP-1) stimulés au LPS. (A) Schéma du protocole expérimental. Les MVs de *L. casei* BL23 (LC-MVs) et de *L. plantarum* WCFS-1 (LP-MVs) ont été purifiées sur gradient de densité selon le protocole décrit par da Silva Barreira *et al.* (2022). Ensuite, les cellules THP-1 différenciées en macrophages ont été traitées 30 min avec les MVs de lactobacilles (*L. casei* BL23 et de *L. plantarum* WCFS-1) puis la production de TNF- $\alpha$  a été mesurée par ELISA après 3 heures de stimulation avec (LPS) ou sans (PBS). (B) La quantité de TNF- $\alpha$  sécrétée a été normalisée aux conditions non traitées. 0,005 et 0,0025  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de vésicules et de solutions contrôles ont été ajoutées aux THP-1 avant l'addition de LPS. Les conditions contrôles correspondent à la fraction recueillie en appliquant le protocole de purification des MVs sur le milieu de culture MRS. La condition PBS correspondant à l'addition d'un volume de tampon PBS égale à celui ajouté dans la condition LPS. En effet, les LPS sont dissous et dilués dans du tampon PBS.

Les résultats montrent que le traitement des THP-1 par les vésicules de *L. plantarum* WCFS-1 et par les vésicules de *L. casei* BL23 n'entraîne pas de sécrétion de TNF- $\alpha$  (condition PBS) (Fig. 47B). Cependant, on peut remarquer que le prétraitement des cellules par les vésicules de *L. casei* BL23 entraîne une légère augmentation de la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire après 3 h de stimulation avec du LPS. À l'inverse, le traitement par les vésicules de *L. plantarum* WCFS-1 entraîne une réduction significative de la sécrétion de cytokine pro-inflammatoire TNF- $\alpha$  conformément aux résultats de la littérature (Kuhn *et al.*, 2020). Les mécanismes mis en jeu dans la réduction de sécrétion de TNF- $\alpha$  médiée par les vésicules de *L. plantarum* restent encore flous, mais il est possible que les vésicules

réduisent l'interaction du LPS avec les récepteurs de l'immunité innée. Les vésicules pourraient également moduler la signalisation cellulaire comme décrit dans plusieurs travaux (Choi *et al.*, 2020a; S.-H. Kim *et al.*, 2022). Les vésicules de *L. casei* BL23 n'ont quant à elles pas d'effets anti-inflammatoires, mais semblent à l'inverse légèrement renforcer la sécrétion de TNF- $\alpha$  induite par le LPS. Conformément, Bäuerl *et al.* (2020) ont montré *in vitro* sur un modèle de cellules épithéliales (HT-29) que les MVs de *L. casei* BL23 ont un effet pro-inflammatoire modéré et sont capables d'induire la phosphorylation des récepteurs interagissant avec le facteur de croissance épidermique (EGFR). De manière intéressante, les auteurs suggèrent que l'activité des vésicules de *L. casei* BL23 serait principalement due à la présence des PGHs (LCABL\_00230 et LCABL\_02770) (Bäuerl *et al.*, 2020).

### 3.4. Conclusions – perspectives

Nos résultats montrent que les vésicules de *L. casei* BL23 ont un effet immunomodulateur réduit dans le modèle cellulaire de monocytes différenciés en macrophages THP-1. Les vésicules n'ont pas d'effet en absence de stimulation, mais semblent légèrement renforcer la sécrétion de TNF- $\alpha$  induite par les LPS. Nos résultats confirment également l'effet immunomodulateur des MVs de *L. plantarum* WCFS-1 dans le modèle des cellules THP-1 stimulées par les LPS.

Les hydrolases du peptidoglycane (LCABL\_00230 et LCABL\_02770) et la protéine GroEL sont des protéines connues pour leur activité immunomodulatrice et anti-inflammatoire (Domínguez Rubio *et al.*, 2017; Rieu *et al.*, 2014). Ces protéines sont présentes dans les vésicules, ce qui pourrait ainsi expliquer le rôle modulateur des vésicules de *L. casei* BL23 sur le modèle de cellules épithéliales HT-29 (Bäuerl *et al.*, 2020; Domínguez Rubio *et al.*, 2017). Toutefois, il faut noter que les effets sur les modèles cellulaires sont modérés. C'est pourquoi il serait intéressant d'étudier l'effet des vésicules et la contribution des PGHs dans un modèle de colite induite par le DSS chez la souris. En effet, Choi *et al.* (2020) ont pu montrer que le gavage de souris par des MVs d'une bactérie du genre *Lactocaseibacillus* permet d'atténuer l'inflammation intestinale en modulant les voies de régulation du réticulum endoplasmique (Choi *et al.*, 2020a).









## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

### Caractérisation des vésicules membranaires de *Lacticaseibacillus casei* BL23

Dans le cadre de cette thèse, nous avons tout d'abord souhaité approfondir et compléter le travail de caractérisation des MVs de *Lacticaseibacillus casei* BL23 initié par Rubio *et al.* (2017). Ainsi, nous avons montré par des analyses en microscopie électronique que le diamètre des MVs libérées par *L. casei* BL23 suit une distribution normale avec une majorité de vésicules comprises entre 50 et 100 nm de diamètre. De plus, nous avons observé que les vésicules sont libérées tout au long de la croissance lorsque les bactéries sont cultivées dans des conditions de culture standard (c.-à-d. milieu MRS, 37 °C, pH 5.8). Notamment, les MVs sont principalement libérées au cours de la phase exponentielle de croissance comme précédemment observé chez d'autres bactéries telles que les *Pseudomonas* (Baeza *et al.*, 2021 ; Pérez-Cruz *et al.*, 2021). Une analyse protéomique par spectrométrie de masse, nous a permis de détecter près de 810 protéines associées aux fractions vésiculaires de *L. casei* BL23. Parmi ces protéines, un nombre significatif de protéines de phages et de protéines de la paroi bactérienne a été identifié suggérant ainsi leur implication dans la biogenèse des vésicules.

Afin de compléter le travail de caractérisation des MVs de *L. casei* BL23, il serait intéressant d'étudier la composition lipidique de leur membrane. Les premiers résultats d'une analyse réalisée avec la plateforme de lipidomique de Dijon nous ont permis de montrer que les MVs de *L. casei* BL23 ont une composition en phospholipides très similaire à la composition de la membrane cytoplasmique avec plus de 90 % de phosphatidylglycérols. Toutefois, aucune cardiolipine n'a été détectée dans les MVs de *L. casei* BL23 contrairement à la membrane cytoplasmique qui contient 5 % de cardiolipines (résultats non publiés et non présentés dans ce manuscrit). Ces analyses doivent encore être répétées pour avoir des triplicats biologiques. Notons que ces résultats sont conformes aux observations précédemment réalisées chez des streptocoques de groupe A (Resch *et al.*, 2016). Les mécanismes expliquant l'absence de cardiolipines dans les MVs de bactéries n'ont toutefois pas encore été élucidés. Cependant, il a été montré que les cardiolipines entraînent de fortes déstabilisations des vésicules formées de phosphatidylcholine, suggérant ainsi que les cardiolipines peuvent être exclues lors de la biogenèse des MVs bactériennes (Tomšič *et al.*, 2005). Il serait intéressant d'étudier la localisation des cardiolipines dans les membranes de *L. casei* BL23 au cours de la croissance, afin de comprendre plus précisément les mécanismes mis en jeu lors de leur exclusion des vésicules bactériennes. En effet, il a été montré chez *Bacillus subtilis* que les cardiolipines sont préférentiellement localisées au niveau des septa de division et aux pôles des bactéries (Strahl and Errington, 2017). Or, il est connu que les vésicules peuvent se former au septum de division comme observé chez plusieurs bactéries telles *Salmonella Typhimurium* ou encore *Acinetobacter baumannii* (Deatherage *et al.*, 2009 ; Koning *et al.*, 2013). Cette contradiction suggère ainsi que les cardiolipides sont exclues de manière spécifique des vésicules bactériennes ou bien que leur formation au niveau des septa de division est un mécanisme de biogenèse minoritaire.

Il serait également intéressant de caractériser la taille, la quantité et la composition des MVs libérées par *L. casei* BL23 cultivées en présence de stress (température, pH, antimicrobiens) ou sous forme de biofilm. En effet, il a été montré que la composition et la quantité de vésicules produites par des souches de *L. casei* et *L. plantarum* est fortement impactée par le pH, la vitesse d'agitation et la présence d'oxygène lors de la culture (Müller *et al.*, 2021). De même, la taille et la composition des vésicules produites par les biofilms peuvent différer de celles produites par les bactéries planctoniques (Schooling and Beveridge, 2006; Toyofuku *et al.*, 2012). Ces variations de la taille, de la quantité et de

la composition des vésicules peuvent ainsi permettre la mise en évidence de nouveaux mécanismes de biogenèse et peuvent également être utilisées pour optimiser les activités des vésicules. Par exemple, il a été montré que l'effet anti-inflammatoire des vésicules de *L. casei* et de *L. plantarum* a pu être optimisé en modifiant les conditions de culture de ces bactéries (Müller *et al.*, 2021).

### **Biogenèse des vésicules membranaires de *Lactocaseibacillus casei* BL23**

Ce travail de thèse a permis de démontrer la contribution du prophage PLE2 dans la production des vésicules membranaires par *L. casei* BL23 en absence ou en présence de stress génotoxiques. Notamment, nous avons montré que l'induction spontanée du prophage PLE2 est responsable d'une partie significative de la production de vésicules. Ces résultats sont cohérents avec la présence importante de protéines phagiques dans les fractions vésiculaires de *L. casei* BL23 (Domínguez Rubio *et al.*, 2017). De plus, l'implication de séquences phagiques dans la production de vésicules a également été observée chez d'autres bactéries à Gram positif dont *Bacillus subtilis* et *Lactococcus lactis* (Liu *et al.*, 2022a, 2022b; Toyofuku *et al.*, 2017a). Le rôle des systèmes holine-endolysine dans la production de vésicules par les bactéries a été démontré dans ces différents travaux. En effet, les holines sont des protéines qui s'autoassemblent dans les membranes pour former des canaux permettant aux endolysines (ou hydrolases du peptidoglycane phagiques) d'accéder au peptidoglycane. Ainsi, la dégradation localisée du peptidoglycane crée des perforations de la paroi par lesquelles bourgeonnent les membranes, ce qui conduit à la libération de vésicules. Notre travail a permis de montrer que les prophages PLE1, PLE2 et PLE3 de *L. casei* BL23 possèdent des systèmes holine-endolysines exprimés dans les conditions standards de croissance et en présence de stress génotoxiques, qui contribuent à la production de vésicules. Dans ce contexte, ces résultats suggèrent que les systèmes holine-endolysine pourraient être utilisés pour augmenter la production de vésicules de manière inductible dans des souches industrielles par exemple. En effet, nous pourrions envisager à l'avenir de développer des souches produisant des vésicules membranaires de manière inductible grâce à l'introduction de systèmes holine-endolysine dans les génomes.

Afin de compléter ce travail, il serait intéressant d'identifier les déterminants moléculaires mis en jeu dans l'interaction entre les différents prophages de *L. casei* BL23 et leurs rôles sur la biogenèse des vésicules. En particulier, le comportement satellite des prophages PLE1 et PLE3 vis-à-vis de PLE2 est à approfondir. Pour ce faire, nous pourrions essayer d'obtenir une souche de *L. casei* BL23 curée pour PLE2 et analyser les conséquences sur la répllication des autres prophages et sur la production de vésicules.

Nos travaux montrent également que des mécanismes indépendants des phages sont mis en jeu dans la production des vésicules. En particulier, la présence importante d'hydrolases du peptidoglycane (PHGs) dans les fractions vésiculaires suggère leur implication dans la biogenèse des vésicules de *L. casei* BL23. En effet, les PHGs ayant un impact direct sur l'intégrité de la paroi, elles pourraient être impliquées dans la libération de vésicules (Devos *et al.*, 2017; Pollacka, 1992a). De plus, il a été montré chez *Bacillus subtilis* que des MVs sont libérées de manière plus importante en présence de stress (surfactant, choc froid, carence nutritionnelle, déficience en oxygène) en raison de l'augmentation de l'expression de plusieurs PHGs (Abe *et al.*, 2021). De même, il est possible que l'induction de l'expression des PHGs chez *L. casei* BL23 puisse contribuer à la production de vésicules par les bactéries de manière indépendante des prophages. Afin d'étudier la contribution des PHGs dans la production de vésicules, il serait intéressant de déterminer la quantité de vésicules libérées en absence et en

présence de stress, par des souches mutées pour des gènes codants différentes PHGs. Nous pourrions notamment analyser les souches mutantes DDB003 à DDB009 construites dans le cadre de cette thèse.

Nous pourrions également comparer la production de vésicules de *L. casei* BL23 à d'autres *Lacticaseibacillus* telles que *L. paracasei* ATCC334. En effet, *L. casei* BL23 et *L. paracasei* ATCC334 sont des souches génétiquement très proches qui diffèrent principalement par la présence d'éléments génétiques mobiles (prophages, transposons) et par la présence du plasmide pLSEI1 dans la souche *L. paracasei* ATCC334 (Cai *et al.*, 2009). De plus, nous disposons à l'UMR PAM d'une banque de mutants de *L. paracasei* ATCC334 obtenue par intégration aléatoire de transposons dans le chromosome bactérien (Palud *et al.*, 2018). Afin d'identifier les gènes impliqués dans la production de vésicules, nous pourrions réaliser un criblage de cette banque en utilisant une stratégie similaire à celle précédemment réalisée pour l'analyse des banques d'*Escherichia coli* (Kulp *et al.*, 2015; McBroom *et al.*, 2006). Cette stratégie de criblage repose sur la détection du LPS des OMVs libérées dans les surnageants de culture par les bactéries cultivées en microplaques de 96 puits. De cette manière, les auteurs ont pu identifier près de 150 gènes impliqués dans la production d'OMVs par *Escherichia coli* (Kulp *et al.*, 2015; McBroom *et al.*, 2006). Dans le cas des lactobacilles, la quantification des MVs (dépourvues de LPS) pourrait être réalisée par marquage avec des sondes lipophiles fluorescentes (ex. diphenylhexatriène, FM 1-43). Ainsi, l'intensité de fluorescence émise par les MVs marquées permettrait de quantifier les vésicules présentes dans les surnageants de culture. Le criblage de la banque de mutant de *L. paracasei* ATCC334 et l'identification des gènes impliqués dans la production de vésicules constituerait ainsi une avancée majeure dans l'étude de la biogenèse de vésicules de lactobacilles.

### **Rôle des vésicules membranaires de *Lacticaseibacillus casei* BL23**

Dans cette partie du travail, nous avons souhaité identifier les rôles joués par les vésicules membranaires de *L. casei* BL23. Nous nous sommes principalement intéressés à leurs activités probiotiques notamment antimicrobiennes et immunomodulatrices.

Notre travail a permis de montrer pour la première fois que les vésicules libérées par *L. casei* BL23 présentent une activité antibiofilm contre plusieurs bactéries pathogènes et bactéries d'altérations parmi lesquelles *S. Enteritidis*, *H. alvei*, *C. freundii*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. epidermidis* et *E. faecalis*. En particulier, les vésicules de *L. casei* BL23 impactent de manière plus importante la formation de biofilms par *S. Enteritidis*, sans être associées à une activité bactéricide ou bactériostatique. De plus, nous avons montré que les MVs de *L. casei* BL23 n'ont pas d'effet sur les biofilms matures ou en cours de maturation de *S. Enteritidis*, mais sont capables d'inhiber les étapes précoces de la formation des biofilms. Enfin, nos travaux ont permis de démontrer que l'activité antibiofilm des MVs de *L. casei* BL23 est liée à leur contenu protéique. Notamment, deux PGHs ont pu être associées à cette activité antibiofilm. À l'avenir, il serait intéressant de poursuivre le travail d'identification des déterminants moléculaires responsables des activités antibiofilms des vésicules. En particulier, nos résultats suggèrent que la protéine LCABL\_21960 puisse être directement impliquée dans l'activité antibiofilm des vésicules de *L. casei* BL23. C'est pourquoi, nous pourrions tenter d'induire l'expression de cette PGH dans des souches d'*Escherichia coli* adaptées à l'expression de gènes hautement toxiques afin de pouvoir purifier cette protéine et tester son rôle dans la formation du biofilm de *S. Enteritidis* (Saïda *et al.*, 2006).

Il serait également intéressant de trouver des conditions de culture permettant d'optimiser l'activité antibiofilm des vésicules de *L. casei* BL23. En effet, il a été montré que la modification des conditions de culture des lactobacilles peut impacter la composition et la quantité de vésicules libérées (Müller *et al.*, 2021). Notons que l'identification des protéines responsables des activités antibiofilm permettrait de faciliter ce travail d'optimisation. De plus, nous pourrions alors envisager le développement de souches de *L. casei* libérant des vésicules chargées de protéines aux propriétés antibiofilms. Actuellement, les surnageants industriels de fermentation sont généralement détruits. Notre travail suggère que les vésicules de probiotiques présentes dans ces déchets de fermentation pourraient être valorisées et utilisées pour leurs propriétés antimicrobiennes et antibiofilms. Cette idée est renforcée par le fait que les vésicules d'autres espèces de lactobacilles ont été associées à des activités antimicrobiennes. Notamment, il a été montré que les MVs de *L. acidophilus* sont enrichies en peptides antimicrobiens capables d'inhiber la croissance d'autres bactéries (Dean *et al.*, 2020). De même, les MVs de *L. plantarum* présentent une forte activité bactéricide sur la bactérie d'altération *Shewanella putrefaciens* (Lee *et al.*, 2021).

De nombreux travaux de la littérature ont montré que les MVs bactériennes sont présentes en grande quantité et jouent un rôle important dans la formation des biofilms (Beveridge *et al.*, 1997; Berleman *et al.*, 2014; Turnbull *et al.*, 2016b). Notamment, les vésicules sont une voie importante de libération d'ADN extracellulaire qui est impliqué dans la structuration de la matrice des biofilms (Campoccia *et al.*, 2021). À ce jour, la présence de MVs dans les biofilms de lactobacilles a été très peu étudiée et la majorité des observations ont été réalisées avec des biofilms de *L. reuteri* (Grande *et al.*, 2017, p. 17938; Maccelli *et al.*, 2020; Puca *et al.*, 2019). De plus, les rôles joués par les vésicules au sein des biofilms de lactobacilles sont encore inconnus. Dans le cadre de nos travaux, nous avons montré que les vésicules de *L. casei* BL23 ont une activité antibiofilm contre certaines bactéries pathogènes et certaines bactéries d'altération. Toutefois, la présence d'ADN dans les vésicules de *L. casei* BL23 suggère qu'elles puissent également favoriser la formation du biofilm bactérien (Domínguez Rubio *et al.*, 2017). C'est pourquoi nous pourrions étudier l'impact des MVs de *L. casei* BL23 sur la formation des biofilms d'autres lactobacilles telles que *L. paracasei* ATCC334 et *L. rhamnosus* GG. En effet, il est possible que les vésicules contribuent à sélectionner les bactéries présentes dans le biofilm, en excluant certaines bactéries et en favorisant d'autres bactéries génétiquement proches. Cette hypothèse est renforcée par le fait que les lactobacilles sont connues pour leurs activités antibiofilm dirigées contre certaines bactéries pathogènes (Carvalho *et al.*, 2021). Les anticorps dirigés contre les vésicules de *L. casei* BL23 que nous avons développés dans le cadre de cette thèse pourront être utilisés afin de visualiser les vésicules au sein de différents biofilms par des approches d'immunogold ou d'immunofluorescence. De cette manière, nous pourrions identifier la nature des interactions entre les vésicules de *L. casei* BL23 et les différentes bactéries présentes dans les biofilms (bactéries pathogènes, bactéries d'altération ou encore lactobacilles).

Un travail de caractérisation plus générale pourrait également être fait en comparant la taille, la quantité et la composition (protéique et lipidique) des vésicules produites par les lactobacilles cultivés en biofilm avec les vésicules produites en condition planctonique. Cette caractérisation pourrait ainsi permettre de mettre en évidence le rôle de certaines protéines sécrétées par les vésicules dans les biofilms. Par exemple, les travaux du laboratoire ont montré que *L. paracasei* ATCC334 surexprime la protéine GroEL lorsque les bactéries sont présentes dans un biofilm. De plus, il a été montré que GroEL est présente dans les vésicules de nombreuses espèces de lactobacilles (Al-Nedawi *et al.*, 2015;

Domínguez Rubio *et al.*, 2017). Ainsi, la sécrétion importante de GroEL par les MVs dans les biofilms pourrait participer à la formation et au mode de vie biofilm. Les anticorps anti-GroEL que nous avons développés dans le cadre de cette thèse pourront être utilisés pour vérifier cette hypothèse par des expérimentations d'immunoempreinte et d'immunofluorescence.

Comme expliqué précédemment, notre travail a permis de montrer l'effet inhibiteur de vésicules de *L. casei* BL23 sur la formation de biofilm de *S. Enteritidis* dans un modèle en plaque de polystyrène. Afin de compléter ce travail, nous pourrions également analyser les effets des vésicules sur d'autres surfaces abiotiques (acier, verre, polyester) ainsi que sur des surfaces biotiques. En particulier, il serait intéressant de déterminer si les MVs de *L. casei* BL23 ont un effet *in vivo* (souris, poisson-zèbre) sur la colonisation du tractus gastro-intestinal par *S. Enteritidis*. De même, l'effet des vésicules sur l'adhésion, l'invasion et la réplication de *S. Enteritidis* dans des modèles cellulaires *in vitro* (monocytes THP-1, lignée épithéliale HT-29) pourraient être étudiés. En effet, la réduction de l'attachement aux surfaces due à l'activité des vésicules pourrait se traduire par la diminution de la capacité infectieuse de *S. Enteritidis*. Les anticorps dirigés contre les vésicules de *L. casei* BL23 que nous avons développés pourront être utilisés afin d'approfondir l'analyse des interactions entre les vésicules, *S. Enteritidis* et les cellules de l'hôte. Notamment, des immunofluorescences pourraient être réalisées afin de déterminer si les vésicules de *L. casei* BL23 sont internalisées par les cellules épithéliales (HT-29) comme précédemment décrit pour *L. rhamnosus* et *L. plantarum* (Bajic *et al.*, 2020; Champagne-Jorgensen *et al.*, 2021b). Les voies d'internalisation pourraient ensuite être identifiées en utilisant des inhibiteurs d'endocytose (ex. dynasore, chlorpromazine) (Bajic *et al.*, 2020, p. 29; Champagne-Jorgensen *et al.*, 2021b; Morishita *et al.*, 2021).

Plus largement, l'étude du rôle des vésicules dans la communication avec les cellules de l'hôte est une thématique que nous pourrions également approfondir. Nos résultats et les travaux publiés par Bäuerl *et al.* (2020) ont montré que les vésicules de *L. casei* BL23 ont un rôle de régulation modéré dans un modèle de macrophages dérivés de monocytes THP-1 et dans des lignées de cellules épithéliales HT-29. Toutefois, il a été montré que l'activité immunomodulatrice des MVs libérées par les lactobacilles peut varier selon les conditions dans lesquelles elles sont cultivées (Müller *et al.*, 2021). C'est pourquoi il serait intéressant d'essayer d'optimiser les activités bénéfiques de ces vésicules en modulant la composition des milieux, les paramètres physico-chimiques de culture ou le mode de vie des bactéries (planctonique, biofilm). Les voies de signalisation, les récepteurs activés dans les cellules de l'hôte et les mécanismes de régulation mis en jeu par les vésicules pourraient être ensuite étudiés. Par exemple, les quantités importantes d'ARN dans les fractions vésiculaires de *L. casei* BL23 (Domínguez Rubio *et al.*, 2017) pourraient moduler l'expression génétique des cellules de l'hôte par un phénomène de silencing comme précédemment décrit pour les vésicules de *L. plantarum* (Yu *et al.*, 2022).



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abe, K., Nomura, N., Suzuki, S., 2020. Biofilms: hot spots of horizontal gene transfer (HGT) in aquatic environments, with a focus on a new HGT mechanism. *FEMS Microbiol Ecol* 96, fiae031. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiae031>
- Abe, K., Toyofuku, M., Nomura, N., Obana, N., 2021. Autolysis-mediated membrane vesicle formation in *Bacillus subtilis*. *Environ Microbiol* 23, 2632–2647. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15502>
- Abildgaard, A., Kern, T., Pedersen, O., Hansen, T., Wegener, G., Lund, S., 2019. The antidepressant-like effect of probiotics and their faecal abundance may be modulated by the cohabiting gut microbiota in rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 29, 98–110. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2018.10.011>
- Acehan, D., Santarella-Mellwig, R., Devos, D.P., 2014. A bacterial tubulovesicular network. *Journal of Cell Science* 127, 277–280. <https://doi.org/10.1242/jcs.137596>
- Ackermann, H.-W., 2007. 5500 Phages examined in the electron microscope. *Arch Virol* 152, 227–243. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0849-1>
- Aguirre, M., Collins, M.D., 1993. Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J Appl Bacteriol* 75, 95–107. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb02753.x>
- Alav, I., Sutton, J.M., Rahman, K.M., 2018. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. *J Antimicrob Chemother* 73, 2003–2020. <https://doi.org/10.1093/jac/dky042>
- AlFaleh, K., Anabrees, J., 2014. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* CD005496. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD005496.pub4>
- Ali, Y., Kot, W., Atamer, Z., Hinrichs, J., Vogensen, F.K., Heller, K.J., Neve, H., 2013. Classification of lytic bacteriophages attacking dairy *Leuconostoc* starter strains. *Appl Environ Microbiol* 79, 3628–3636. <https://doi.org/10.1128/AEM.00076-13>
- Allen, S.J., Martinez, E.G., Gregorio, G.V., Dans, L.F., 2010. Probiotics for treating acute infectious diarrhoea. *Cochrane Database Syst Rev* CD003048. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003048.pub3>
- Al-Nedawi, K., Mian, M.F., Hossain, N., Karimi, K., Mao, Y.-K., Forsythe, P., Min, K.K., Stanis, A.M., Kunze, W.A., Bienenstock, J., 2015. Gut commensal microvesicles reproduce parent bacterial signals to host immune and enteric nervous systems. *FASEB J.* 29, 684–695. <https://doi.org/10.1096/fj.14-259721>
- Alves, N.J., Turner, K.B., Medintz, I.L., Walper, S.A., 2016. Protecting enzymatic function through directed packaging into bacterial outer membrane vesicles. *Sci Rep* 6, 24866. <https://doi.org/10.1038/srep24866>
- Anderl, J.N., Franklin, M.J., Stewart, P.S., 2000. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 1818–1824. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.7.1818-1824.2000>
- Anderson, W., Kozak, D., Coleman, V.A., Jämting, Å.K., Trau, M., 2013. A comparative study of submicron particle sizing platforms: accuracy, precision and resolution analysis of polydisperse particle size distributions. *J Colloid Interface Sci* 405, 322–330. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2013.02.030>
- Andreoni, F., Toyofuku, M., Menzi, C., Kalawong, R., Mairpady Shambat, S., François, P., Zinkernagel, A.S., Eberl, L., 2019. Antibiotics Stimulate Formation of Vesicles in *Staphylococcus aureus* in both Phage-Dependent and -Independent Fashions and via Different Routes. *Antimicrob Agents Chemother* 63, e01439-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.01439-18>
- Andriantsoanirina, V., Teolis, A.-C., Xin, L.X., Butel, M.J., Aires, J., 2014. *Bifidobacterium longum* and *Bifidobacterium breve* isolates from preterm and full term neonates: comparison of cell surface properties. *Anaerobe* 28, 212–215. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.07.002>



- Anton, B.P., Raleigh, E.A., 2016. Complete Genome Sequence of NEB 5-alpha, a Derivative of *Escherichia coli* K-12 DH5α. *Genome Announc* 4, e01245-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01245-16>
- Archambaud, C., Nahori, M.-A., Soubigou, G., Bécavin, C., Laval, L., Lechat, P., Smokvina, T., Langella, P., Lecuit, M., Cossart, P., 2012. Impact of lactobacilli on orally acquired listeriosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 16684–16689. <https://doi.org/10.1073/pnas.1212809109>
- Asano, S., Suzuki, K., Iijima, K., Motoyama, Y., Kuriyama, H., Kitagawa, Y., 2007. Effects of morphological changes in beer-spoilage lactic acid bacteria on membrane filtration in breweries. *J Biosci Bioeng* 104, 334–338. <https://doi.org/10.1263/jbb.104.334>
- Aschtgen, M.-S., Lynch, J.B., Koch, E., Schwartzman, J., McFall-Ngai, M., Ruby, E., 2016. Rotation of *Vibrio fischeri* Flagella Produces Outer Membrane Vesicles That Induce Host Development. *J. Bacteriol.* 198, 2156–2165. <https://doi.org/10.1128/JB.00101-16>
- Attinger, C., Wolcott, R., 2012. Clinically Addressing Biofilm in Chronic Wounds. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 1, 127–132. <https://doi.org/10.1089/wound.2011.0333>
- Bäckhed, F., Ley, R.E., Sonnenburg, J.L., Peterson, D.A., Gordon, J.I., 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307, 1915–1920. <https://doi.org/10.1126/science.1104816>
- Bacteriophages - MeSH - NCBI [WWW Document], 2022 URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68001435> (accessed 9.22.22).
- Baeza, N., Delgado, L., Comas, J., Mercade, E., 2021. Phage-Mediated Explosive Cell Lysis Induces the Formation of a Different Type of O-IMV in *Shewanella vesiculosa* M7T. *Front. Microbiol.* 12, 713669. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.713669>
- Bager, R.J., Persson, G., Nesta, B., Soriani, M., Serino, L., Jeppsson, M., Nielsen, T.K., Bojesen, A.M., 2013. Outer membrane vesicles reflect environmental cues in *Gallibacterium anatis*. *Veterinary Microbiology* 167, 565–572. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.09.005>
- Bahr, M.M., Amer, M.S., Abo-El-Sooud, K., Abdallah, A.N., El-Tookhy, O.S., 2020. Preservation techniques of stem cells extracellular vesicles: a gate for manufacturing of clinical grade therapeutic extracellular vesicles and long-term clinical trials. *Int J Vet Sci Med* 8, 1–8. <https://doi.org/10.1080/23144599.2019.1704992>
- Bajic, S.S., Cañas, M.-A., Tolinacki, M., Badia, J., Sánchez, B., Golic, N., Margolles, A., Baldomá, L., Ruas-Madiedo, P., 2020. Proteomic profile of extracellular vesicles released by *Lactiplantibacillus plantarum* BGAN8 and their internalization by non-polarized HT29 cell line. *Sci Rep* 10, 21829. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78920-z>
- Baltimore, D., 1971. Expression of animal virus genomes. *Bacteriol Rev* 35, 235–241. <https://doi.org/10.1128/br.35.3.235-241.1971>
- Barefoot, S.F., Klaenhammer, T.R., 1983. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol* 45, 1808–1815. <https://doi.org/10.1128/aem.45.6.1808-1815.1983>
- Barnhart, M.M., Chapman, M.R., 2006. Curli biogenesis and function. *Annu Rev Microbiol* 60, 131–147. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.60.080805.142106>
- Bäuerl, C., Abitayeva, G., Sosa-Carrillo, S., Mencher-Beltrán, A., Navarro-Lleó, N., Coll-Marqués, J.M., Zúñiga-Cabrera, M., Shaikhin, S., Pérez-Martínez, G., 2019. P40 and P75 Are Singular Functional Muramidases Present in the *Lactobacillus casei* /*paracasei*/*rhamnosus* Taxon. *Front Microbiol* 10, 1420. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01420>
- Bäuerl, C., Coll-Marqués, J.M., Tarazona-González, C., Pérez-Martínez, G., 2020. *Lactobacillus casei* extracellular vesicles stimulate EGFR pathway likely due to the presence of proteins P40 and P75 bound to their surface. *Sci Rep* 10, 19237. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75930-9>
- Bäuerl, C., Pérez-Martínez, G., Yan, F., Polk, D.B., Monedero, V., 2010. Functional analysis of the p40 and p75 proteins from *Lactobacillus casei* BL23. *J Mol Microbiol Biotechnol* 19, 231–241. <https://doi.org/10.1159/000322233>
- Baumgarten, T., Sperling, S., Seifert, J., von Bergen, M., Steiniger, F., Wick, L.Y., Heipieper, H.J., 2012. Membrane Vesicle Formation as a Multiple-Stress Response Mechanism Enhances

- Pseudomonas putida* DOT-T1E Cell Surface Hydrophobicity and Biofilm Formation. Appl Environ Microbiol 78, 6217–6224. <https://doi.org/10.1128/AEM.01525-12>
- Behzadi, E., Mahmoodzadeh Hosseini, H., Imani Fooladi, A.A., 2017. The inhibitory impacts of *Lactobacillus rhamnosus* GG-derived extracellular vesicles on the growth of hepatic cancer cells. Microb Pathog 110, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.06.016>
- Belkaid, Y., Harrison, O.J., 2017. Homeostatic Immunity and the Microbiota. Immunity 46, 562–576. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.04.008>
- Berleman, J.E., Allen, S., Danielewicz, M.A., Remis, J.P., Gorur, A., Cunha, J., Hadi, M.Z., Zusman, D.R., Northen, T.R., Witkowska, H.E., Auer, M., 2014. The lethal cargo of *Myxococcus xanthus* outer membrane vesicles. Front. Microbiol. 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00474>
- Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C., Gil, A., 2012. Probiotic mechanisms of action. Ann Nutr Metab 61, 160–174. <https://doi.org/10.1159/000342079>
- Bernadac, A., Gavioli, M., Lazzaroni, J.-C., Raina, S., Llobès, R., 1998. *Escherichia coli* tol-pal Mutants Form Outer Membrane Vesicles. J. Bacteriol. 180, 4872–4878. <https://doi.org/10.1128/JB.180.18.4872-4878.1998>
- Berne, C., Ellison, C.K., Ducret, A., Brun, Y.V., 2018. Bacterial adhesion at the single-cell level. Nat Rev Microbiol 16, 616–627. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0057-5>
- Bernier, S.P., Lebeaux, D., DeFrancesco, A.S., Valomon, A., Soubigou, G., Coppée, J.-Y., Ghigo, J.-M., Beloin, C., 2013. Starvation, together with the SOS response, mediates high biofilm-specific tolerance to the fluoroquinolone ofloxacin. PLoS Genet 9, e1003144. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003144>
- Beveridge, T.J., Makin, S.A., Kadurugamuwa, J.L., Li, Z., 1997. Interactions between biofilms and the environment. FEMS Microbiol Rev 20, 291–303. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00315.x>
- Biller, S.J., Schubotz, F., Roggensack, S.E., Thompson, A.W., Summons, R.E., Chisholm, S.W., 2014a. Bacterial Vesicles in Marine Ecosystems. Science 343, 183–186. <https://doi.org/10.1126/science.1243457>
- Biller, S.J., Schubotz, F., Roggensack, S.E., Thompson, A.W., Summons, R.E., Chisholm, S.W., 2014b. Bacterial Vesicles in Marine Ecosystems. Science 343, 183–186. <https://doi.org/10.1126/science.1243457>
- Bin-Nun, A., Bromiker, R., Wilschanski, M., Kaplan, M., Rudensky, B., Caplan, M., Hammerman, C., 2005. Oral probiotics prevent necrotizing enterocolitis in very low birth weight neonates. J Pediatr 147, 192–196. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2005.03.054>
- Bitto, N.J., Chapman, R., Pidot, S., Costin, A., Lo, C., Choi, J., D’Cruze, T., Reynolds, E.C., Dashper, S.G., Turnbull, L., Whitchurch, C.B., Stinear, T.P., Stacey, K.J., Ferrero, R.L., 2017. Bacterial membrane vesicles transport their DNA cargo into host cells. Sci Rep 7, 7072. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07288-4>
- Boles, B.R., Horswill, A.R., 2008. Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. PLoS Pathog 4, e1000052. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000052>
- Boles, B.R., Thoendel, M., Singh, P.K., 2005. Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. Mol Microbiol 57, 1210–1223. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04743.x>
- Bonnington, K.E., Kuehn, M.J., 2016. Outer Membrane Vesicle Production Facilitates LPS Remodeling and Outer Membrane Maintenance in *Salmonella* during Environmental Transitions. mBio 7, e01532-16, /mbio/7/5/e01532-16.atom. <https://doi.org/10.1128/mBio.01532-16>
- Bonnington, K.E., Kuehn, M.J., 2014. Protein selection and export via outer membrane vesicles. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research 1843, 1612–1619. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.12.011>
- Bos, R., van der Mei, H.C., Busscher, H.J., 1999. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions--its mechanisms and methods for study. FEMS Microbiol Rev 23, 179–230. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1999.tb00396.x>

- Brennan, C.A., Hunt, J.R., Kremer, N., Krasity, B.C., Apicella, M.A., McFall-Ngai, M.J., Ruby, E.G., 2014. A model symbiosis reveals a role for sheathed-flagellum rotation in the release of immunogenic lipopolysaccharide. *eLife* 3, e01579. <https://doi.org/10.7554/eLife.01579>
- Brown, L., Kessler, A., Cabezas-Sanchez, P., Luque-Garcia, J.L., Casadevall, A., 2014. Extracellular vesicles produced by the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis* are disrupted by the lipopeptide surfactin. *Mol Microbiol* 93, 183–198. <https://doi.org/10.1111/mmi.12650>
- Bruttin, A., Brüssow, H., 2005. Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 2874–2878. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.7.2874-2878.2005>
- Burdett, I.D.J., Murray, R.G.E., 1974. Electron Microscope Study of Septum Formation in *Escherichia coli* Strains B and B/r During Synchronous Growth. *Journal of Bacteriology* 119, 1039–1056. <https://doi.org/10.1128/JB.119.3.1039-1056.1974>
- Butel, M.-J., 2014. Probiotics, gut microbiota and health. *Médecine et Maladies Infectieuses* 44, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2013.10.002>
- Cahill, J., Young, R., 2019. Phage Lysis: Multiple Genes for Multiple Barriers. *Adv Virus Res* 103, 33–70. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2018.09.003>
- Cai, H., Thompson, R., Budinich, M.F., Broadbent, J.R., Steele, J.L., 2009. Genome sequence and comparative genome analysis of *Lactobacillus casei*: insights into their niche-associated evolution. *Genome Biol Evol* 1, 239–257. <https://doi.org/10.1093/gbe/evp019>
- Calendar, R.L. (Ed.), 2006. *The Bacteriophages*, Second Edition. ed. Oxford University Press, Oxford, New York.
- Callaway, A., Kostrzewa, M., Willershausen, B., Schmidt, F., Thiede, B., Küpper, H., Kneist, S., 2013. Identification of Lactobacilli from deep carious lesions by means of species-specific PCR and MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin Lab* 59, 1373–1379. <https://doi.org/10.7754/clin.lab.2013.121225>
- Campbell, A., 2003. The future of bacteriophage biology. *Nat Rev Genet* 4, 471–477. <https://doi.org/10.1038/nrg1089>
- Campoccia, D., Montanaro, L., Arciola, C.R., 2021. Tracing the origins of extracellular DNA in bacterial biofilms: story of death and predation to community benefit. *Biofouling* 37, 1022–1039. <https://doi.org/10.1080/08927014.2021.2002987>
- Camu, N., De Winter, T., Verbrugghe, K., Cleenwerck, I., Vandamme, P., Takrama, J.S., Vancanneyt, M., De Vuyst, L., 2007. Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. *Appl Environ Microbiol* 73, 1809–1824. <https://doi.org/10.1128/AEM.02189-06>
- Cannon, J.P., Lee, T.A., Bolanos, J.T., Danziger, L.H., 2005. Pathogenic relevance of *Lactobacillus*: a retrospective review of over 200 cases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 24, 31–40. <https://doi.org/10.1007/s10096-004-1253-y>
- Carnell-Morris, P., Tannetta, D., Siupa, A., Hole, P., Dragovic, R., 2017. Analysis of Extracellular Vesicles Using Fluorescence Nanoparticle Tracking Analysis. *Methods Mol Biol* 1660, 153–173. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7253-1\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7253-1_13)
- Carvalho, F.M., Teixeira-Santos, R., Mergulhão, F.J.M., Gomes, L.C., 2020. The Use of Probiotics to Fight Biofilms in Medical Devices: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Microorganisms* 9, E27. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010027>
- Carvalho, F.M., Teixeira-Santos, R., Mergulhão, F.J.M., Gomes, L.C., LEPABE—Laboratory for Process Engineering, Environment, Biotechnology and Energy, Faculty of Engineering, University of Porto, Rua Dr. Roberto Frias, 4200-465 Porto, Portugal, 2021. Targeting biofilms in medical devices using probiotic cells: a systematic review. *AIMS Materials Science* 8, 501–523. <https://doi.org/10.3934/matricsci.2021031>
- Casjens, S., 2003. Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far? *Mol Microbiol* 49, 277–300. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03580.x>
- Casjens, S.R., Hendrix, R.W., 2015. Bacteriophage lambda: Early pioneer and still relevant. *Virology* 479–480, 310–330. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.010>

- Champagne-Jorgensen, K., Jose, T.A., Stanisz, A.M., Mian, M.F., Hynes, A.P., Bienenstock, J., 2021a. Bacterial membrane vesicles and phages in blood after consumption of *Lactocaseibacillus rhamnosus* JB-1. *Gut Microbes* 13, 1993583. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1993583>
- Champagne-Jorgensen, K., Mian, M.F., McVey Neufeld, K.-A., Stanisz, A.M., Bienenstock, J., 2021b. Membrane vesicles of *Lactocaseibacillus rhamnosus* JB-1 contain immunomodulatory lipoteichoic acid and are endocytosed by intestinal epithelial cells. *Sci Rep* 11, 13756. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93311-8>
- Chatterjee, DAS, 1967. Electron Microscopic Observations on the Excretion of Cell-wall Material by *Vibrio cholerae* 16.
- Chegini, Z., Khoshbayan, A., Taati Moghadam, M., Farahani, I., Jazireian, P., Shariati, A., 2020. Bacteriophage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: a review. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 19, 45. <https://doi.org/10.1186/s12941-020-00389-5>
- Chia, T.W.R., Goulter, R.M., McMeekin, T., Dykes, G.A., Fegan, N., 2009. Attachment of different *Salmonella* serovars to materials commonly used in a poultry processing plant. *Food Microbiol* 26, 853–859. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.05.012>
- Chitcholtan, K., Hampton, M.B., Keenan, J.I., 2008. Outer membrane vesicles enhance the carcinogenic potential of *Helicobacter pylori*. *Carcinogenesis* 29, 2400–2405. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn218>
- Choi, J., Kim, Y.-K., Han, P.-L., 2019. Extracellular Vesicles Derived from *Lactobacillus plantarum* Increase BDNF Expression in Cultured Hippocampal Neurons and Produce Antidepressant-like Effects in Mice. *Exp Neurobiol* 28, 158–171. <https://doi.org/10.5607/en.2019.28.2.158>
- Choi, J.H., Moon, C.M., Shin, T.-S., Kim, E.K., McDowell, A., Jo, M.-K., Joo, Y.H., Kim, S.-E., Jung, H.-K., Shim, K.-N., Jung, S.-A., Kim, Y.-K., 2020a. *Lactobacillus paracasei*-derived extracellular vesicles attenuate the intestinal inflammatory response by augmenting the endoplasmic reticulum stress pathway. *Exp Mol Med* 52, 423–437. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0359-3>
- Choi, J.H., Moon, C.M., Shin, T.-S., Kim, E.K., McDowell, A., Jo, M.-K., Joo, Y.H., Kim, S.-E., Jung, H.-K., Shim, K.-N., Jung, S.-A., Kim, Y.-K., 2020b. *Lactobacillus paracasei*-derived extracellular vesicles attenuate the intestinal inflammatory response by augmenting the endoplasmic reticulum stress pathway. *Exp Mol Med* 52, 423–437. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0359-3>
- Chopin, A., Bolotin, A., Sorokin, A., Ehrlich, S.D., Chopin, M., 2001. Analysis of six prophages in *Lactococcus lactis* IL1403: different genetic structure of temperate and virulent phage populations. *Nucleic Acids Res* 29, 644–651. <https://doi.org/10.1093/nar/29.3.644>
- Ciofu, O., Beveridge, T.J., Kadurugamuwa, J., Walther-Rasmussen, J., Høiby, N., 2000. Chromosomal -lactamase is packaged into membrane vesicles and secreted from *Pseudomonas aeruginosa* 6.
- Clarke, A.J., 2018. The “hole” story of predatory outer-membrane vesicles. *Can. J. Microbiol.* 64, 589–599. <https://doi.org/10.1139/cjm-2017-0466>
- Clarke, T.C., Black, L.I., Stussman, B.J., Barnes, P.M., Nahin, R.L., 2015. Trends in the Use of Complementary Health Approaches Among Adults: United States, 2002–2012. *Natl Health Stat Report* 1–16.
- Cocucci, E., Racchetti, G., Meldolesi, J., 2009. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol* 19, 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.11.003>
- Code | ICTV [WWW Document], 2022 URL <https://ictv.global/about/code> (accessed 9.22.22).
- Coelho, C., Brown, L., Maryam, M., Vij, R., Smith, D.F.Q., Burnet, M.C., Kyle, J.E., Heyman, H.M., Ramirez, J., Prados-Rosales, R., Lauvau, G., Nakayasu, E.S., Brady, N.R., Hamacher-Brady, A., Coppens, I., Casadevall, A., 2019. *Listeria monocytogenes* virulence factors, including listeriolysin O, are secreted in biologically active extracellular vesicles. *J Biol Chem* 294, 1202–1217. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006472>

- Coenye, T., Nelis, H.J., 2010. In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. *J Microbiol Methods* 83, 89–105. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.08.018>
- Colagiorgi, A., Bruini, I., Di Ciccio, P.A., Zanardi, E., Ghidini, S., Ianieri, A., 2017. *Listeria monocytogenes* Biofilms in the Wonderland of Food Industry. *Pathogens* 6, E41. <https://doi.org/10.3390/pathogens6030041>
- Conly, J.M., Stein, K., 1992. The production of menaquinones (vitamin K2) by intestinal bacteria and their role in maintaining coagulation homeostasis. *Prog Food Nutr Sci* 16, 307–343.
- Cooper, I.R., 2016. A review of current methods using bacteriophages in live animals, food and animal products intended for human consumption. *J Microbiol Methods* 130, 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.07.027>
- Corr, S.C., Li, Y., Riedel, C.U., O'Toole, P.W., Hill, C., Gahan, C.G.M., 2007. Bacteriocin production as a mechanism for the anti-infective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 7617–7621. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700440104>
- Corthay, A., 2009. How do regulatory T cells work? *Scand J Immunol* 70, 326–336. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2009.02308.x>
- Costantini, P.E., Vanpouille, C., Firrincieli, A., Cappelletti, M., Margolis, L., Ñahui Palomino, R.A., 2021. Extracellular Vesicles Generated by Gram-Positive Bacteria Protect Human Tissues Ex Vivo From HIV-1 Infection. *Front Cell Infect Microbiol* 11, 822882. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.822882>
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P., 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318–1322. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>
- Coumans, F.A.W., Brisson, A.R., Buzas, E.I., Dignat-George, F., Drees, E.E.E., El-Andaloussi, S., Emanuelli, C., Gasecka, A., Hendrix, A., Hill, A.F., Lacroix, R., Lee, Y., van Leeuwen, T.G., Mackman, N., Mäger, I., Nolan, J.P., van der Pol, E., Pegtel, D.M., Sahoo, S., Siljander, P.R.M., Sturk, G., de Wever, O., Nieuwland, R., 2017. Methodological Guidelines to Study Extracellular Vesicles. *Circ. Res.* 120, 1632–1648. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.309417>
- Court, D.L., Oppenheim, A.B., Adhya, S.L., 2007. A new look at bacteriophage lambda genetic networks. *J Bacteriol* 189, 298–304. <https://doi.org/10.1128/JB.01215-06>
- Crowley, J.T., Toledo, A.M., LaRocca, T.J., Coleman, J.L., London, E., Benach, J.L., 2013. Lipid Exchange between *Borrelia burgdorferi* and Host Cells. *PLoS Pathog* 9, e1003109. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003109>
- Cvjetkovic, A., Jang, S.C., Konečná, B., Höög, J.L., Sihlbom, C., Lässer, C., Lötvall, J., 2016. Detailed Analysis of Protein Topology of Extracellular Vesicles-Evidence of Unconventional Membrane Protein Orientation. *Sci Rep* 6, 36338. <https://doi.org/10.1038/srep36338>
- da Silva Barreira David, Lapaquette Pierre, Novion Ducassou Julia, Couté Yohann, Guzzo Jean, Rieu Aurélie, 2022. Spontaneous Prophage Induction Contributes to the Production of Membrane Vesicles by the Gram-Positive Bacterium *Lactocaseibacillus casei* BL23. *mBio*. <https://doi.org/10.1128/mbio.02375-22>
- Davis, C.N., Phillips, H., Tomes, J.J., Swain, M.T., Wilkinson, T.J., Brophy, P.M., Morphey, R.M., 2019. The importance of extracellular vesicle purification for downstream analysis: A comparison of differential centrifugation and size exclusion chromatography for helminth pathogens. *PLoS Negl Trop Dis* 13, e0007191. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007191>
- De Keersmaecker, S.C.J., Verhoeven, T.L.A., Desair, J., Marchal, K., Vanderleyden, J., Nagy, I., 2006. Strong antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG against *Salmonella* Typhimurium is due to accumulation of lactic acid. *FEMS Microbiol Lett* 259, 89–96. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00250.x>
- de Melo, A.G., Levesque, S., Moineau, S., 2018. Phages as friends and enemies in food processing. *Curr Opin Biotechnol* 49, 185–190. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.09.004>
- de Moreno de LeBlanc, A., Chaves, S., Carmuega, E., Weill, R., Antoine, J., Perdígón, G., 2008. Effect of long-term continuous consumption of fermented milk containing probiotic bacteria on

- mucosal immunity and the activity of peritoneal macrophages. *Immunobiology* 213, 97–108. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2007.07.002>
- Dean, S.N., Leary, D.H., Sullivan, C.J., Oh, E., Walper, S.A., 2019. Isolation and characterization of *Lactobacillus*-derived membrane vesicles. *Sci Rep* 9, 877. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37120-6>
- Dean, S.N., Rimmer, M.A., Turner, K.B., Phillips, D.A., Caruana, J.C., Hervey, W.J., Leary, D.H., Walper, S.A., 2020. *Lactobacillus acidophilus* Membrane Vesicles as a Vehicle of Bacteriocin Delivery. *Front. Microbiol.* 11, 710. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00710>
- Deatherage, B.L., Cookson, B.T., 2012. Membrane Vesicle Release in Bacteria, Eukaryotes, and Archaea: a Conserved yet Underappreciated Aspect of Microbial Life. *Infect. Immun.* 80, 1948–1957. <https://doi.org/10.1128/IAI.06014-11>
- Deatherage, B.L., Lara, J.C., Bergsbaken, T., Barrett, S.L.R., Lara, S., Cookson, B.T., 2009. Biogenesis of bacterial membrane vesicles. *Molecular Microbiology* 72, 1395–1407. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06731.x>
- Dehghani, M., Montange, R.K., Olszowy, M.W., Pollard, D., 2021. An Emerging Fluorescence-Based Technique for Quantification and Protein Profiling of Extracellular Vesicles. *SLAS Technol* 26, 189–199. <https://doi.org/10.1177/2472630320970458>
- del Rio, B., Binetti, A.G., Martín, M.C., Fernández, M., Magadán, A.H., Alvarez, M.A., 2007. Multiplex PCR for the detection and identification of dairy bacteriophages in milk. *Food Microbiol* 24, 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.03.001>
- Devillard, E., McIntosh, F.M., Duncan, S.H., Wallace, R.J., 2007. Metabolism of Linoleic Acid by Human Gut Bacteria: Different Routes for Biosynthesis of Conjugated Linoleic Acid. *Journal of Bacteriology* 189, 2566–2570. <https://doi.org/10.1128/JB.01359-06>
- Deville, S., Berckmans, P., Van Hoof, R., Lambrichts, I., Salvati, A., Nelissen, I., 2021. Comparison of extracellular vesicle isolation and storage methods using high-sensitivity flow cytometry. *PLoS One* 16, e0245835. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245835>
- Devos, S., Van Oudenhove, L., Stremersch, S., Van Putte, W., De Rycke, R., Van Driessche, G., Vitse, J., Raemdonck, K., Devreese, B., 2015. The effect of imipenem and diffusible signaling factors on the secretion of outer membrane vesicles and associated Ax21 proteins in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Front. Microbiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00298>
- Devos, S., Van Putte, W., Vitse, J., Van Driessche, G., Stremersch, S., Van Den Broek, W., Raemdonck, K., Braeckmans, K., Stahlberg, H., Kudryashev, M., Savvides, S.N., Devreese, B., 2017. Membrane vesicle secretion and prophage induction in multidrug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia* in response to ciprofloxacin stress: Ciprofloxacin-induced membrane vesicle secretion. *Environmental Microbiology* 19, 3930–3937. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13793>
- Dias, A.M.M., Douhard, R., Hermetet, F., Regimbeau, M., Lopez, T.E., Gonzalez, D., Masson, S., Marcion, G., Chaumonnot, K., Uyanik, B., Causse, S.Z., Rieu, A., Hadi, T., Basset, C., Chluba, J., Grober, J., Guzzo, J., Neiers, F., Ortega-Deballon, P., Demidov, O.N., Lirussi, F., Garrido, C., 2021. *Lactobacillus* stress protein GroEL prevents colonic inflammation. *J Gastroenterol* 56, 442–455. <https://doi.org/10.1007/s00535-021-01774-3>
- Dias, C.O., dos Santos Opuski de Almeida, J., Pinto, S.S., de Oliveira Santana, F.C., Verruck, S., Müller, C.M.O., Prudêncio, E.S., de Mello Castanho Amboni, R.D., 2018. Development and physico-chemical characterization of microencapsulated bifidobacteria in passion fruit juice: A functional non-dairy product for probiotic delivery. *Food Bioscience* 24, 26–36. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.05.006>
- Die Bedeutung der Übermikroskopie für die Virusforschung | SpringerLink [WWW Document], 1939 URL <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01243399> (accessed 9.22.22).
- Dieterle, M.E., Fina Martin, J., Durán, R., Nemirovsky, S.I., Sanchez Rivas, C., Bowman, C., Russell, D., Hatfull, G.F., Cambillau, C., Piuri, M., 2016. Characterization of prophages containing

- “evolved” Dit/Tal modules in the genome of *Lactobacillus casei* BL23. *Appl Microbiol Biotechnol* 100, 9201–9215. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7727-x>
- Djordjevic, D., Wiedmann, M., McLandsborough, L.A., 2002. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 68, 2950–2958. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.6.2950-2958.2002>
- Dobro, M.J., Oikonomou, C.M., Piper, A., Cohen, J., Guo, K., Jensen, T., Tadayon, J., Donermeyer, J., Park, Y., Solis, B.A., Kj, A., Chen, S., Chang, Y.-W., Shi, J., Subramanian, P., Iancu, C.V., Li, Z., Briegel, A., Tocheva, E.I., Pilhofer, M., Jensen, G.J., 2017. Uncharacterized Bacterial Structures Revealed by Electron Cryotomography. *Journal of Bacteriology* 199, 14.
- Domínguez Rubio, A.P., Martínez, J.H., Martínez Casillas, D.C., Coluccio Leskow, F., Piuri, M., Pérez, O.E., 2017. *Lactobacillus casei* BL23 Produces Microvesicles Carrying Proteins That Have Been Associated with Its Probiotic Effect. *Front Microbiol* 8, 1783. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01783>
- Doran, J.L., Collinson, S.K., Burian, J., Sarlós, G., Todd, E.C., Munro, C.K., Kay, C.M., Banser, P.A., Peterkin, P.I., Kay, W.W., 1993. DNA-based diagnostic tests for *Salmonella* species targeting *agfA*, the structural gene for thin, aggregative fimbriae. *J Clin Microbiol* 31, 2263–2273. <https://doi.org/10.1128/jcm.31.9.2263-2273.1993>
- Dorward, D.W., Garon, C.F., 1990a. DNA Is Packaged within Membrane-Derived Vesicles of Gram-Negative but Not Gram-Positive Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 1960–1962. <https://doi.org/10.1128/AEM.56.6.1960-1962.1990>
- Dorward, D.W., Garon, C.F., 1990b. DNA Is Packaged within Membrane-Derived Vesicles of Gram-Negative but Not Gram-Positive Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 1960–1962. <https://doi.org/10.1128/AEM.56.6.1960-1962.1990>
- Dragovic, R.A., Gardiner, C., Brooks, A.S., Tannetta, D.S., Ferguson, D.J.P., Hole, P., Carr, B., Redman, C.W.G., Harris, A.L., Dobson, P.J., Harrison, P., Sargent, I.L., 2011. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine* 7, 780–788. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.04.003>
- Dronkers, T.M.G., Ouwehand, A.C., Rijkers, G.T., 2020. Global analysis of clinical trials with probiotics. *Heliyon* 6, e04467. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04467>
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), 2010. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to live yoghurt cultures and improved lactose digestion (ID 1143, 2976) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal* 8, 1763. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1763>
- Eichinger, I., Schmitz-Esser, S., Schmid, M., Fisher, C.R., Bright, M., 2014. Symbiont-driven sulfur crystal formation in a thiotrophic symbiosis from deep-sea hydrocarbon seeps: Endosymbiont-driven sulfur crystal formation. *Environmental Microbiology Reports* 6, 364–372. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12149>
- Elhenawy, W., Bording-Jorgensen, M., Valguarnera, E., Haurat, M.F., Wine, E., Feldman, M.F., 2016. LPS Remodeling Triggers Formation of Outer Membrane Vesicles in *Salmonella*. *mBio* 7, e00940-16, /mbio/7/4/e00940-16.atom. <https://doi.org/10.1128/mBio.00940-16>
- Elli, M., Zink, R., Rytz, A., Reniero, R., Morelli, L., 2000. Iron requirement of *Lactobacillus* spp. in completely chemically defined growth media. *J Appl Microbiol* 88, 695–703. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01013.x>
- Esoda, C.N., Kuehn, M.J., 2019. *Pseudomonas aeruginosa* Leucine Aminopeptidase Influences Early Biofilm Composition and Structure via Vesicle-Associated Antibiofilm Activity. *mBio* 10, e02548-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.02548-19>
- Evans, A.G.L., Davey, H.M., Cookson, A., Currinn, H., Cooke-Fox, G., Stanczyk, P.J., Whitworth, D.E., 2012. Predatory activity of *Myxococcus xanthus* outer-membrane vesicles and properties of their hydrolase cargo. *Microbiology* 158, 2742–2752. <https://doi.org/10.1099/mic.0.060343-0>

- Ewe, J.-A., Wan-Abdullah, W.-N., Liong, M.-T., 2010. Viability and growth characteristics of *Lactobacillus* in soymilk supplemented with B-vitamins. *Int J Food Sci Nutr* 61, 87–107. <https://doi.org/10.3109/09637480903334163>
- Fàbrega, A., Vila, J., 2013. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clin Microbiol Rev* 26, 308–341. <https://doi.org/10.1128/CMR.00066-12>
- Faddetta, T., Renzone, G., Vassallo, A., Rimini, E., Nasillo, G., Buscarino, G., Agnello, S., Licciardi, M., Botta, L., Scaloni, A., Palumbo Piccionello, A., Puglia, A.M., Gallo, G., 2022. *Streptomyces coelicolor* Vesicles: Many Molecules To Be Delivered. *Appl Environ Microbiol* 88, e0188121. <https://doi.org/10.1128/AEM.01881-21>
- Falagas, M.E., Betsi, G.I., Athanasiou, S., 2007. Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis. *Clin Microbiol Infect* 13, 657–664. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01688.x>
- Fauquet, C.M., 1999. TAXONOMY, CLASSIFICATION AND NOMENCLATURE OF VIRUSES. *Encyclopedia of Virology* 1730–1756. <https://doi.org/10.1006/rwvi.1999.0277>
- Feiner, R., Argov, T., Rabinovich, L., Sigal, N., Borovok, I., Herskovits, A.A., 2015. A new perspective on lysogeny: prophages as active regulatory switches of bacteria. *Nat Rev Microbiol* 13, 641–650. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3527>
- Finkel, S.E., Kolter, R., 2001. DNA as a nutrient: novel role for bacterial competence gene homologs. *J Bacteriol* 183, 6288–6293. <https://doi.org/10.1128/JB.183.21.6288-6293.2001>
- Flemming, H.-C., 2002. Biofouling in water systems--cases, causes and countermeasures. *Appl Microbiol Biotechnol* 59, 629–640. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1066-9>
- Flemming, H.-C., Baveye, P., Neu, T.R., Stoodley, P., Szewzyk, U., Wingender, J., Wuertz, S., 2021. Who put the film in biofilm? The migration of a term from wastewater engineering to medicine and beyond. *NPJ Biofilms Microbiomes* 7, 10. <https://doi.org/10.1038/s41522-020-00183-3>
- Flemming, H.-C., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 8, 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A., Kjelleberg, S., 2016. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol* 14, 563–575. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
- Flemming, H.-C., Wuertz, S., 2019. Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nat Rev Microbiol* 17, 247–260. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0158-9>
- Florez, C., Raab, J.E., Cooke, A.C., Schertzer, J.W., 2017. Membrane Distribution of the *Pseudomonas* Quinolone Signal Modulates Outer Membrane Vesicle Production in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio* 8, mBio.01034-17, e01034-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.01034-17>
- Foligne, B., Nutten, S., Grangette, C., Dennin, V., Goudercourt, D., Poirer, S., Dewulf, J., Brassart, D., Mercenier, A., Pot, B., 2007. Correlation between in vitro and in vivo immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World J Gastroenterol* 13, 236–243. <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i2.236>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization (Eds.), 2006. Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation, FAO food and nutrition paper. Food and Agriculture Organization of the United Nations : World Health Organization, Rome.
- Food safety [WWW Document], 2022 URL <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety> (accessed 9.9.22).
- Foodborne diseases [WWW Document], 2022 URL <https://www.who.int/health-topics/foodborne-diseases> (accessed 9.9.22).
- Fradiani, P.A., Petrucca, A., Ascenzioni, F., Di Nucci, G., Teggi, A., Bilancini, S., Cipriani, P., 2010. Endocarditis caused by *Lactobacillus jensenii* in an immunocompetent patient. *J Med Microbiol* 59, 607–609. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.017764-0>



- Frias, A., Manresa, A., de Oliveira, E., López-Iglesias, C., Mercade, E., 2010. Membrane Vesicles: A Common Feature in the Extracellular Matter of Cold-Adapted Antarctic Bacteria. *Microb Ecol* 59, 476–486. <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9622-9>
- Fulsundar, S., Harms, K., Flaten, G.E., Johnsen, P.J., Chopade, B.A., Nielsen, K.M., 2014. Gene Transfer Potential of Outer Membrane Vesicles of *Acinetobacter baylyi* and Effects of Stress on Vesiculation. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 3469–3483. <https://doi.org/10.1128/AEM.04248-13>
- Furi, I., Momen-Heravi, F., Szabo, G., 2017. Extracellular vesicle isolation: present and future. *Ann Transl Med* 5, 263. <https://doi.org/10.21037/atm.2017.03.95>
- Gamaliel, J.P., Silva, T.P., Zarantonello, V., Dias, F.F., Melo, R.C.N., 2017. Increased production of outer membrane vesicles by cultured freshwater bacteria in response to ultraviolet radiation. *Microbiological Research* 194, 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.08.002>
- Gänzle, M.G., 2015. Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science, Food Microbiology • Functional Foods and Nutrition* 2, 106–117. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.03.001>
- García, P., Ladero, V., Alonso, J.C., Suárez, J.E., 1999. Cooperative interaction of CI protein regulates lysogeny of *Lactobacillus casei* by bacteriophage A2. *J Virol* 73, 3920–3929. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.5.3920-3929.1999>
- García, P., Ladero, V., Suárez, J.E., 2003. Analysis of the morphogenetic cluster and genome of the temperate *Lactobacillus casei* bacteriophage A2. *Arch Virol* 148, 1051–1070. <https://doi.org/10.1007/s00705-003-0008-x>
- García, P., Martínez, B., Obeso, J.M., Rodríguez, A., 2008. Bacteriophages and their application in food safety. *Lett Appl Microbiol* 47, 479–485. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02458.x>
- Garneau, J.E., Moineau, S., 2011. Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations. *Microb Cell Fact* 10 Suppl 1, S20. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-S1-S20>
- Gasbarrini, G., Bonvicini, F., Gramenzi, A., 2016. Probiotics History. *J Clin Gastroenterol* 50 Suppl 2, Proceedings from the 8th Probiotics, Prebiotics&New Foods for Microbiota and Human Health meeting held in Rome, Italy on September 13-15, 2015, S116–S119. <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000000697>
- Gelibter, S., Marostica, G., Mandelli, A., Siciliani, S., Podini, P., Finardi, A., Furlan, R., 2022. The impact of storage on extracellular vesicles: A systematic study. *J Extracell Vesicles* 11, e12162. <https://doi.org/10.1002/jev2.12162>
- Geller, B.L., Ivey, R.G., Trempey, J.E., Hettinger-Smith, B., 1993. Cloning of a chromosomal gene required for phage infection of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* C2. *J Bacteriol* 175, 5510–5519. <https://doi.org/10.1128/jb.175.17.5510-5519.1993>
- George, S.K., Lauková, L., Weiss, R., Semak, V., Fendl, B., Weiss, V.U., Steinberger, S., Allmaier, G., Tripisciano, C., Weber, V., 2021. Comparative Analysis of Platelet-Derived Extracellular Vesicles Using Flow Cytometry and Nanoparticle Tracking Analysis. *Int J Mol Sci* 22, 3839. <https://doi.org/10.3390/ijms22083839>
- Gerstel, U., Römling, U., 2003. The *csgD* promoter, a control unit for biofilm formation in *Salmonella typhimurium*. *Res Microbiol* 154, 659–667. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2003.08.005>
- Giaouris, E., Heir, E., Desvaux, M., Hébraud, M., Mørretrø, T., Langsrud, S., Doulgeraki, A., Nychas, G.-J., Kačániová, M., Czaczyk, K., Ölmez, H., Simões, M., 2015. Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. *Front Microbiol* 6, 841. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00841>
- Gibson, D.L., White, A.P., Snyder, S.D., Martin, S., Heiss, C., Azadi, P., Surette, M., Kay, W.W., 2006. *Salmonella* produces an O-antigen capsule regulated by AgfD and important for environmental persistence. *J Bacteriol* 188, 7722–7730. <https://doi.org/10.1128/JB.00809-06>

- Gill, S., Catchpole, R., Forterre, P., 2019. Extracellular membrane vesicles in the three domains of life and beyond. *FEMS Microbiology Reviews* 43, 273–303.  
<https://doi.org/10.1093/femsre/fuy042>
- Gilmore, M.S., Skaugen, M., Nes, I., 1996. Enterococcus faecalis cytolysin and lactocin S of *Lactobacillus sake*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 69, 129–138.  
<https://doi.org/10.1007/BF00399418>
- Giordani, B., Parolin, C., Vitali, B., 2021. Lactobacilli as Anti-biofilm Strategy in Oral Infectious Diseases: A Mini-Review. *Front. Med. Technol.* 3, 769172.  
<https://doi.org/10.3389/fmedt.2021.769172>
- Goldenberg, J.Z., Yap, C., Lytvyn, L., Lo, C.K.-F., Beardsley, J., Mertz, D., Johnston, B.C., 2017. Probiotics for the prevention of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults and children. *Cochrane Database Syst Rev* 12, CD006095.  
<https://doi.org/10.1002/14651858.CD006095.pub4>
- Golding, I., 2016. Single-Cell Studies of Phage  $\lambda$ : Hidden Treasures Under Occam's Rug. *Annu Rev Virol* 3, 453–472. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042127>
- Golding, I., 2011. Decision making in living cells: lessons from a simple system. *Annu Rev Biophys* 40, 63–80. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-042910-155227>
- González, J.F., Hahn, M.M., Gunn, J.S., 2018. Chronic biofilm-based infections: skewing of the immune response. *Pathog Dis* 76. <https://doi.org/10.1093/femspd/fty023>
- Gordillo Altamirano, F.L., Barr, J.J., 2019. Phage Therapy in the Postantibiotic Era. *Clin Microbiol Rev* 32, e00066-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00066-18>
- Görgens, A., Corso, G., Hagey, D.W., Jawad Wiklander, R., Gustafsson, M.O., Felldin, U., Lee, Y., Bostancioglu, R.B., Sork, H., Liang, X., Zheng, W., Mohammad, D.K., van de Wakker, S.I., Vader, P., Zickler, A.M., Mamand, D.R., Ma, L., Holme, M.N., Stevens, M.M., Wiklander, O.P.B., El Andaloussi, S., 2022. Identification of storage conditions stabilizing extracellular vesicles preparations. *J Extracell Vesicles* 11, e12238. <https://doi.org/10.1002/jev2.12238>
- Gram, L., Huss, H.H., 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. *Int J Food Microbiol* 33, 121–137. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)01134-8](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01134-8)
- Grande, R., Celia, C., Mincione, G., Stringaro, A., Di Marzio, L., Colone, M., Di Marcantonio, M.C., Savino, L., Puca, V., Santoliquido, R., Locatelli, M., Muraro, R., Hall-Stoodley, L., Stoodley, P., 2017. Detection and Physicochemical Characterization of Membrane Vesicles (MVs) of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938. *Front Microbiol* 8, 1040.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01040>
- Grande, R., Di Marcantonio, M.C., Robuffo, I., Pompilio, A., Celia, C., Di Marzio, L., Paolino, D., Codagnone, M., Muraro, R., Stoodley, P., Hall-Stoodley, L., Mincione, G., 2015. *Helicobacter pylori* ATCC 43629/NCTC 11639 Outer Membrane Vesicles (OMVs) from Biofilm and Planktonic Phase Associated with Extracellular DNA (eDNA). *Front. Microbiol.* 6.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01369>
- Grangette, C., Nutten, S., Palumbo, E., Morath, S., Hermann, C., Dewulf, J., Pot, B., Hartung, T., Hols, P., Mercenier, A., 2005. Enhanced antiinflammatory capacity of a *Lactobacillus plantarum* mutant synthesizing modified teichoic acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 10321–10326.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0504084102>
- Guerrero-Mandujano, A., Hernández-Cortez, C., Ibarra, J.A., Castro-Escarpulli, G., 2017. The outer membrane vesicles: Secretion system type zero. *Traffic* 18, 425–432.  
<https://doi.org/10.1111/tra.12488>
- Guglielmotti, D.M., Mercanti, D.J., Reinheimer, J.A., Quiberoni, A.D.L., 2011. Review: efficiency of physical and chemical treatments on the inactivation of dairy bacteriophages. *Front Microbiol* 2, 282. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00282>
- Gupta, V., Garg, R., 2009. Probiotics. *Indian J Med Microbiol* 27, 202–209.  
<https://doi.org/10.4103/0255-0857.53201>

- Haaber, J., Leisner, J.J., Cohn, M.T., Catalan-Moreno, A., Nielsen, J.B., Westh, H., Penadés, J.R., Ingmer, H., 2016. Bacterial viruses enable their host to acquire antibiotic resistance genes from neighbouring cells. *Nat Commun* 7, 13333. <https://doi.org/10.1038/ncomms13333>
- Hagemann, S., Stöger, L., Kappelmann, M., Hassl, I., Ellinger, A., Velimirov, B., 2014. DNA-bearing membrane vesicles produced by *Ahrensia kielensis* and *Pseudoalteromonas marina*: DNA-bearing membrane vesicles. *J. Basic Microbiol.* 54, 1062–1072. <https://doi.org/10.1002/jobm.201300376>
- Hagens, S., Loessner, M.J., 2010. Bacteriophage for biocontrol of foodborne pathogens: calculations and considerations. *Curr Pharm Biotechnol* 11, 58–68. <https://doi.org/10.2174/138920110790725429>
- Halloran, K., Underwood, M.A., 2019. Probiotic mechanisms of action. *Early Hum Dev* 135, 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2019.05.010>
- Hao, H., Zhang, X., Tong, L., Liu, Q., Liang, X., Bu, Y., Gong, P., Liu, T., Zhang, L., Xia, Y., Ai, L., Yi, H., 2021. Effect of Extracellular Vesicles Derived From *Lactobacillus plantarum* Q7 on Gut Microbiota and Ulcerative Colitis in Mice. *Front Immunol* 12, 777147. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.777147>
- Hao, Q., Dong, B.R., Wu, T., 2015. Probiotics for preventing acute upper respiratory tract infections. *Cochrane Database Syst Rev* CD006895. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006895.pub3>
- Harrell, J.E., Hahn, M.M., D’Souza, S.J., Vasicek, E.M., Sandala, J.L., Gunn, J.S., McLachlan, J.B., 2020. *Salmonella* Biofilm Formation, Chronic Infection, and Immunity Within the Intestine and Hepatobiliary Tract. *Front Cell Infect Microbiol* 10, 624622. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.624622>
- Harrison, N.A., Gardner, C.L., da Silva, D.R., Gonzalez, C.F., Lorca, G.L., 2021. Identification of Biomarkers for Systemic Distribution of Nanovesicles From *Lactobacillus johnsonii* N6.2. *Front Immunol* 12, 723433. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.723433>
- Hayashi, J., Hamada, N., Kuramitsu, H.K., 2002. The autolysin of *Porphyromonas gingivalis* is involved in outer membrane vesicle release. *FEMS Microbiology Letters* 216, 217–222. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11438.x>
- Hayer-Hartl, M., Bracher, A., Hartl, F.U., 2016. The GroEL-GroES Chaperonin Machine: A Nano-Cage for Protein Folding. *Trends Biochem Sci* 41, 62–76. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.07.009>
- He, F., Ouwehand, A.C., Isolauri, E., Hosoda, M., Benno, Y., Salminen, S., 2001. Differences in composition and mucosal adhesion of bifidobacteria isolated from healthy adults and healthy seniors. *Curr Microbiol* 43, 351–354. <https://doi.org/10.1007/s002840010315>
- He, Xinlong, Li, S., Yin, Yi, Xu, J., Gong, W., Li, G., Qian, L., Yin, Yinyan, He, Xiaoqin, Guo, T., Huang, Y., Lu, F., Cao, J., 2019. Membrane Vesicles Are the Dominant Structural Components of Ceftazidime-Induced Biofilm Formation in an Oxacillin-Sensitive MRSA. *Front Microbiol* 10, 571. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00571>
- Hecker, M., Pané-Farré, J., Völker, U., 2007. SigB-dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and related gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol* 61, 215–236. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093445>
- Hempel, S., Newberry, S.J., Maher, A.R., Wang, Z., Miles, J.N.V., Shanman, R., Johnsen, B., Shekelle, P.G., 2012. Probiotics for the prevention and treatment of antibiotic-associated diarrhea: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 307, 1959–1969. <https://doi.org/10.1001/jama.2012.3507>
- Hetrick, E.M., Schoenfisch, M.H., 2006. Reducing implant-related infections: active release strategies. *Chem Soc Rev* 35, 780–789. <https://doi.org/10.1039/b515219b>
- Hickey, C.A., Kuhn, K.A., Donermeyer, D.L., Porter, N.T., Jin, C., Cameron, E.A., Jung, H., Kaiko, G.E., Wegorzewska, M., Malvin, N.P., Glowacki, R.W.P., Hansson, G.C., Allen, P.M., Martens, E.C., Stappenbeck, T.S., 2015. Colitogenic *Bacteroides thetaiotaomicron* Antigens Access Host Immune Cells in a Sulfatase-Dependent Manner via Outer Membrane Vesicles. *Cell Host & Microbe* 17, 672–680. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.002>

- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C., Sanders, M.E., 2014. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 11, 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Hinrichs, J., 2001. Incorporation of whey proteins in cheese. *International Dairy Journal, Cheese Ripening and Technology* 11, 495–503. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00071-1](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00071-1)
- Hoekstra, D., van der Laan, J.W., de Leij, L., Witholt, B., 1976. Release of outer membrane fragments from normally growing *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 455, 889–899. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(76\)90058-4](https://doi.org/10.1016/0005-2736(76)90058-4)
- Holo, H., Jeknic, Z., Daeschel, M., Stevanovic, S., Nes, I.F., 2001. Plantaricin W from *Lactobacillus plantarum* belongs to a new family of two-peptide lantibiotics. *Microbiology (Reading)* 147, 643–651. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-3-643>
- Hong, S.-S., Lee, H.-A., Kim, J.Y., Jeong, J.-W., Shim, J.-J., Lee, J.L., Sim, J.-H., Chung, Y., Kim, O., 2018. In vitro and in vivo inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus paracasei* HP7. *Lab Anim Res* 34, 216–222. <https://doi.org/10.5625/lar.2018.34.4.216>
- How Does Tunable Resistive Pulse Sensing Measure Particles? [WWW Document], 2022. URL <https://www.izon.com/trps/how-it-works> (accessed 11.2.22).
- Howard-Varona, C., Hargreaves, K.R., Abedon, S.T., Sullivan, M.B., 2017. Lysogeny in nature: mechanisms, impact and ecology of temperate phages. *ISME J* 11, 1511–1520. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.16>
- Hoy, B., Geppert, T., Boehm, M., Reisen, F., Plattner, P., Gadermaier, G., Sewald, N., Ferreira, F., Briza, P., Schneider, G., Backert, S., Wessler, S., 2012. Distinct Roles of Secreted HtrA Proteases from Gram-negative Pathogens in Cleaving the Junctional Protein and Tumor Suppressor E-cadherin. *J. Biol. Chem.* 287, 10115–10120. <https://doi.org/10.1074/jbc.C111.333419>
- Hu, R., Lin, H., Wang, M., Zhao, Y., Liu, H., Min, Y., Yang, X., Gao, Y., Yang, M., 2021. *Lactobacillus reuteri*-derived extracellular vesicles maintain intestinal immune homeostasis against lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in broilers. *J Animal Sci Biotechnol* 12, 25. <https://doi.org/10.1186/s40104-020-00532-4>
- Isolauri, E., Arvola, T., Sütas, Y., Moilanen, E., Salminen, S., 2000. Probiotics in the management of atopic eczema. *Clin Exp Allergy* 30, 1604–1610. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.2000.00943.x>
- Ito, R., Ishihara, K., Shoji, M., Nakayama, K., Okuda, K., 2010. Hemagglutinin/Adhesin domains of *Porphyromonas gingivalis* play key roles in coaggregation with *Treponema denticola*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 60, 251–260. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00737.x>
- Iwabuchi, Y., Nakamura, T., Kusumoto, Y., Nakao, R., Iwamoto, T., Shinozuka, O., Senpuku, H., 2021. Effects of pH on the Properties of Membrane Vesicles Including Glucosyltransferase in *Streptococcus mutans*. *Microorganisms* 9, 2308. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112308>
- Iyer, C., Kusters, A., Sethi, G., Kunnumakkara, A.B., Aggarwal, B.B., Versalovic, J., 2008. Probiotic *Lactobacillus reuteri* promotes TNF-induced apoptosis in human myeloid leukemia-derived cells by modulation of NF-kappaB and MAPK signalling. *Cell Microbiol* 10, 1442–1452. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01137.x>
- Jafarnejad, S., Shab-Bidar, S., Speakman, J.R., Parastui, K., Daneshi-Maskooni, M., Djafarian, K., 2016. Probiotics Reduce the Risk of Antibiotic-Associated Diarrhea in Adults (18-64 Years) but Not the Elderly (>65 Years): A Meta-Analysis. *Nutr Clin Pract* 31, 502–513. <https://doi.org/10.1177/0884533616639399>
- Jandhyala, S.M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., Reddy, D.N., 2015. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol* 21, 8787–8803. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i29.8787>

- Jeon, J., Mok, H.J., Choi, Y., Park, S.C., Jo, H., Her, J., Han, J.-K., Kim, Y.-K., Kim, K.P., Ban, C., 2017. Proteomic analysis of extracellular vesicles derived from *Propionibacterium acnes*. *Proteomics Clin Appl* 11. <https://doi.org/10.1002/prca.201600040>
- Jeong, H., Barbe, V., Lee, C.H., Vallenet, D., Yu, D.S., Choi, S.-H., Couloux, A., Lee, S.-W., Yoon, S.H., Cattolico, L., Hur, C.-G., Park, H.-S., Ségurens, B., Kim, S.C., Oh, T.K., Lenski, R.E., Studier, F.W., Daegelen, P., Kim, J.F., 2009. Genome sequences of *Escherichia coli* B strains REL606 and BL21(DE3). *J Mol Biol* 394, 644–652. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.09.052>
- Jespers, V., Menten, J., Smet, H., Poradosú, S., Abdellati, S., Verhelst, R., Hardy, L., Buvé, A., Crucitti, T., 2012. Quantification of bacterial species of the vaginal microbiome in different groups of women, using nucleic acid amplification tests. *BMC Microbiol* 12, 83. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-83>
- Jeyaram, A., Jay, S.M., 2017. Preservation and Storage Stability of Extracellular Vesicles for Therapeutic Applications. *AAPS J* 20, 1. <https://doi.org/10.1208/s12248-017-0160-y>
- Jo, C.S., Myung, C.H., Yoon, Y.C., Ahn, B.H., Min, J.W., Seo, W.S., Lee, D.H., Kang, H.C., Heo, Y.H., Choi, H., Hong, I.K., Hwang, J.S., 2022. The Effect of *Lactobacillus plantarum* Extracellular Vesicles from Korean Women in Their 20s on Skin Aging. *Curr Issues Mol Biol* 44, 526–540. <https://doi.org/10.3390/cimb44020036>
- Johansen, A.H., Brøndsted, L., Hammer, K., 2003. Identification of operator sites of the CI repressor of phage TP901-1: evolutionary link to other phages. *Virology* 311, 144–156. [https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(03\)00169-7](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(03)00169-7)
- Journal of Extracellular Vesicles [WWW Document], 2012. . Wiley Online Library. [https://doi.org/10.1002/\(ISSN\)2001-3078](https://doi.org/10.1002/(ISSN)2001-3078)
- Juhna, T., Birzniece, D., Larsson, S., Zulenkovs, D., Sharipo, A., Azevedo, N.F., Ménard-Szczebara, F., Castagnet, S., Féliers, C., Keevil, C.W., 2007. Detection of *Escherichia coli* in biofilms from pipe samples and coupons in drinking water distribution networks. *Appl Environ Microbiol* 73, 7456–7464. <https://doi.org/10.1128/AEM.00845-07>
- Kadurugamuwa, J.L., Beveridge, T.J., 1996. Bacteriolytic effect of membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* on other bacteria including pathogens: conceptually new antibiotics. *Journal of bacteriology* 178, 2767–2774. <https://doi.org/10.1128/JB.178.10.2767-2774.1996>
- Kadurugamuwa, J.L., Beveridge, T.J., 1995. Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion. *Journal of bacteriology* 177, 3998–4008. <https://doi.org/10.1128/JB.177.14.3998-4008.1995>
- Kahn, M.E., Barany, F., Smith, H.O., 1983. Transformasomes: specialized membranous structures that protect DNA during *Haemophilus* transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80, 6927–6931. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.22.6927>
- Kaistha, S.D., Umrao, P.D., 2016. Bacteriophage for Mitigation of Multiple Drug Resistant Biofilm Forming Pathogens. *Recent Pat Biotechnol* 10, 184–194. <https://doi.org/10.2174/1872208310666160919122155>
- Kamaguchi, A., Nakayama, K., Ichiyama, S., Nakamura, R., Watanabe, T., Ohta, M., Baba, H., Ohyama, T., 2003a. Effect of *Porphyromonas gingivalis* Vesicles on Coaggregation of *Staphylococcus aureus* to Oral Microorganisms. *Curr Microbiol* 47. <https://doi.org/10.1007/s00284-003-4069-6>
- Kamaguchi, A., Ohyama, T., Sakai, E., Nakamura, R., Watanabe, T., Baba, H., Nakayama, K., 2003b. Adhesins encoded by the gingipain genes of *Porphyromonas gingivalis* are responsible for co-aggregation with *Prevotella intermedia*. *Microbiology (Reading)* 149, 1257–1264. <https://doi.org/10.1099/mic.0.25997-0>
- Kang, E.A., Choi, H.-I., Hong, S.W., Kang, S., Jegal, H.-Y., Choi, E.W., Park, B.-S., Kim, J.S., 2020. Extracellular Vesicles Derived from Kefir Grain *Lactobacillus* Ameliorate Intestinal Inflammation via Regulation of Proinflammatory Pathway and Tight Junction Integrity. *Biomedicine* 8, E522. <https://doi.org/10.3390/biomedicine8110522>

- Kaplan, J.B., 2014. Biofilm matrix-degrading enzymes. *Methods Mol Biol* 1147, 203–213. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0467-9\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0467-9_14)
- Kaplan, J.B., Fine, D.H., 2002. Biofilm dispersal of *Neisseria subflava* and other phylogenetically diverse oral bacteria. *Appl Environ Microbiol* 68, 4943–4950. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.10.4943-4950.2002>
- Kaplan, J.B., Rangunath, C., Ramasubbu, N., Fine, D.H., 2003. Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm cells by an endogenous beta-hexosaminidase activity. *J Bacteriol* 185, 4693–4698. <https://doi.org/10.1128/JB.185.16.4693-4698.2003>
- Kaplan, J.B., Rangunath, C., Velliyagounder, K., Fine, D.H., Ramasubbu, N., 2004. Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 2633–2636. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.7.2633-2636.2004>
- Karska-Wysocki, B., Bazo, M., Smoragiewicz, W., 2010. Antibacterial activity of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Microbiol Res* 165, 674–686. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2009.11.008>
- Katsui, N., Tsuchido, T., Hiramatsu, R., Fujikawa, S., Takano, M., Shibasaki, I., 1982. Heat-induced blebbing and vesiculation of the outer membrane of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 151, 1523–1531. <https://doi.org/10.1128/jb.151.3.1523-1531.1982>
- Keren, R., Mayzel, B., Lavy, A., Polishchuk, I., Levy, D., Fakra, S.C., Pokroy, B., Ilan, M., 2017. Sponge-associated bacteria mineralize arsenic and barium on intracellular vesicles. *Nat Commun* 8, 14393. <https://doi.org/10.1038/ncomms14393>
- Kiliç, A.O., Pavlova, S.I., Alpay, S., Kiliç, S.S., Tao, L., 2001. Comparative study of vaginal *Lactobacillus* phages isolated from women in the United States and Turkey: prevalence, morphology, host range, and DNA homology. *Clin Diagn Lab Immunol* 8, 31–39. <https://doi.org/10.1128/CDLI.8.1.31-39.2001>
- Kiliç, A.O., Pavlova, S.I., Ma, W.G., Tao, L., 1996. Analysis of *Lactobacillus* phages and bacteriocins in American dairy products and characterization of a phage isolated from yogurt. *Appl Environ Microbiol* 62, 2111–2116.
- Kim, H., Kim, M., Myoung, K., Kim, W., Ko, J., Kim, K.P., Cho, E.-G., 2020. Comparative Lipidomic Analysis of Extracellular Vesicles Derived from *Lactobacillus plantarum* APsulloc 331261 Living in Green Tea Leaves Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *IJMS* 21, 8076. <https://doi.org/10.3390/ijms21218076>
- Kim, H.G., Kim, N.-R., Gim, M.G., Lee, J.M., Lee, S.Y., Ko, M.Y., Kim, J.Y., Han, S.H., Chung, D.K., 2008a. Lipoteichoic acid isolated from *Lactobacillus plantarum* inhibits lipopolysaccharide-induced TNF- $\alpha$  production in THP-1 cells and endotoxin shock in mice. *J Immunol* 180, 2553–2561. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.4.2553>
- Kim, H.G., Lee, S.Y., Kim, N.-R., Ko, M.Y., Lee, J.M., Yi, T.-H., Chung, S.K., Chung, D.K., 2008b. Inhibitory effects of *Lactobacillus plantarum* lipoteichoic acid (LTA) on *Staphylococcus aureus* LTA-induced tumor necrosis factor- $\alpha$  production. *J Microbiol Biotechnol* 18, 1191–1196.
- Kim, M.H., Choi, S.J., Choi, H.I., Choi, J.P., Park, H.K., Kim, E.K., Kim, M.J., Moon, B.S., Min, T.K., Rho, M., Cho, Y.J., Yang, S., Kim, Y.K., Kim, Y.Y., Pyun, B.Y., 2018. *Lactobacillus plantarum*-derived Extracellular Vesicles Protect Atopic Dermatitis Induced by *Staphylococcus aureus*-derived Extracellular Vesicles. *Allergy Asthma Immunol Res* 10, 516–532. <https://doi.org/10.4168/aair.2018.10.5.516>
- Kim, O.Y., Park, H.T., Dinh, N.T.H., Choi, S.J., Lee, J., Kim, J.H., Lee, S.-W., Gho, Y.S., 2017. Bacterial outer membrane vesicles suppress tumor by interferon- $\gamma$ -mediated antitumor response. *Nat Commun* 8, 626. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00729-8>
- Kim, S.-H., Lee, J.H., Kim, E.H., Reaney, M.J.T., Shim, Y.Y., Chung, M.J., 2022. Immunomodulatory Activity of Extracellular Vesicles of Kimchi-Derived Lactic Acid Bacteria (*Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus curvatus*, and *Lactiplantibacillus plantarum*). *Foods* 11, 313. <https://doi.org/10.3390/foods11030313>
- Kim, S.-I., Ha, J.Y., Choi, S.-Y., Hong, S.-H., Lee, H.-J., 2022. Use of Bacterial Extracellular Vesicles for Gene Delivery to Host Cells. *Biomolecules* 12, 1171. <https://doi.org/10.3390/biom12091171>

- Kim, S.O., Sheikh, H.I., Ha, S.-D., Martins, A., Reid, G., 2006. G-CSF-mediated inhibition of JNK is a key mechanism for *Lactobacillus rhamnosus*-induced suppression of TNF production in macrophages. *Cell Microbiol* 8, 1958–1971. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00763.x>
- Kim, W., Lee, E.J., Bae, I.-H., Myoung, K., Kim, S.T., Park, P.J., Lee, K.-H., Pham, A.V.Q., Ko, J., Oh, S.H., Cho, E.-G., 2020. *Lactobacillus plantarum*-derived extracellular vesicles induce anti-inflammatory M2 macrophage polarization in vitro. *J Extracell Vesicles* 9, 1793514. <https://doi.org/10.1080/20013078.2020.1793514>
- Kim, Y., Kim, S.-H., Whang, K.-Y., Kim, Y.-J., Oh, S., 2008. Inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 attachment by interactions between lactic acid bacteria and intestinal epithelial cells. *J Microbiol Biotechnol* 18, 1278–1285.
- Klaenhammer, T., Altermann, E., Arigoni, F., Bolotin, A., Breidt, F., Broadbent, J., Cano, R., Chaillou, S., Deutscher, J., Gasson, M., van de Guchte, M., Guzzo, J., Hartke, A., Hawkins, T., Hols, P., Hutkins, R., Kleerebezem, M., Kok, J., Kuipers, O., Lubbers, M., Maguin, E., McKay, L., Mills, D., Nauta, A., Overbeek, R., Pel, H., Pridmore, D., Saier, M., van Sinderen, D., Sorokin, A., Steele, J., O'Sullivan, D., de Vos, W., Weimer, B., Zagorec, M., Siezen, R., 2002. Discovering lactic acid bacteria by genomics. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82, 29–58. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-2029-8\\_3](https://doi.org/10.1007/978-94-017-2029-8_3)
- Klebanoff, S.J., Watts, D.H., Mehlin, C., Headley, C.M., 1999. Lactobacilli and vaginal host defense: activation of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat, cytokine production, and NF-kappaB. *J Infect Dis* 179, 653–660. <https://doi.org/10.1086/314644>
- Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O.P., Leer, R., Turchini, R., Peters, S.A., Sandbrink, H.M., Fiers, M.W.E.J., Stiekema, W., Lankhorst, R.M.K., Bron, P.A., Hoffer, S.M., Groot, M.N.N., Kerkhoven, R., de Vries, M., Ursing, B., de Vos, W.M., Siezen, R.J., 2003. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1990–1995. <https://doi.org/10.1073/pnas.0337704100>
- Klimentová, J., Stulík, J., 2015. Methods of isolation and purification of outer membrane vesicles from gram-negative bacteria. *Microbiol Res* 170, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.09.006>
- Knox, K.W., Vesk, M., Work, E., 1966. Relation Between Excreted Lipopolysaccharide Complexes and Surface Structures of a Lysine-Limited Culture of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 92, 1206–1217. <https://doi.org/10.1128/JB.92.4.1206-1217.1966>
- Kobayashi, H., Uematsu, K., Hirayama, H., Horikoshi, K., 2000. Novel Toluene Elimination System in a Toluene-Tolerant Microorganism. *J. Bacteriol.* 182, 6451–6455. <https://doi.org/10.1128/JB.182.22.6451-6455.2000>
- Kobiler, O., Rokney, A., Friedman, N., Court, D.L., Stavans, J., Oppenheim, A.B., 2005. Quantitative kinetic analysis of the bacteriophage lambda genetic network. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 4470–4475. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500670102>
- Koning, R.I., de Breij, A., Oostergetel, G.T., Nibbering, P.H., Koster, A.J., Dijkshoorn, L., 2013. Cryo-electron tomography analysis of membrane vesicles from *Acinetobacter baumannii* ATCC19606T. *Research in Microbiology* 164, 397–405. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.02.007>
- Konoshenko, M.Y., Lekchnov, E.A., Vlassov, A.V., Laktionov, P.P., 2018. Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends. *Biomed Res Int* 2018, 8545347. <https://doi.org/10.1155/2018/8545347>
- Konstantinov, S.R., Smidt, H., de Vos, W.M., Bruijns, S.C.M., Singh, S.K., Valence, F., Molle, D., Lortal, S., Altermann, E., Klaenhammer, T.R., van Kooyk, Y., 2008. S layer protein A of *Lactobacillus acidophilus* NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 19474–19479. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810305105>
- Koonin, E.V., Dolja, V.V., Krupovic, M., Varsani, A., Wolf, Y.I., Yutin, N., Zerbini, F.M., Kuhn, J.H., 2020. Global Organization and Proposed Megataxonomy of the Virus World. *Microbiol Mol Biol Rev* 84, e00061-19. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00061-19>

- Kotsonis, S.E., Powell, I.B., Pillidge, C.J., Limsowtin, G.K.Y., Hillier, A.J., Davidson, B.E., 2008. Characterization and genomic analysis of phage ascphi28, a phage of the family *Podoviridae* infecting *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 74, 3453–3460. <https://doi.org/10.1128/AEM.02379-07>
- Kuhn, T., Koch, M., Fuhrmann, G., 2020. Probiomimetics—Novel *Lactobacillus*-Mimicking Microparticles Show Anti-Inflammatory and Barrier-Protecting Effects in Gastrointestinal Models. *Small* 16, 2003158. <https://doi.org/10.1002/sml.202003158>
- Kulkarni, H.M., Swamy, Ch.V.B., Jagannadham, M.V., 2014. Molecular Characterization and Functional Analysis of Outer Membrane Vesicles from the Antarctic Bacterium *Pseudomonas syringae* Suggest a Possible Response to Environmental Conditions. *J. Proteome Res.* 13, 1345–1358. <https://doi.org/10.1021/pr4009223>
- Kulp, A., Kuehn, M.J., 2010. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu Rev Microbiol* 64, 163–184. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073413>
- Kulp, A.J., Sun, B., Ai, T., Manning, A.J., Orench-Rivera, N., Schmid, A.K., Kuehn, M.J., 2015. Genome-Wide Assessment of Outer Membrane Vesicle Production in *Escherichia coli*. *PLoS ONE* 10, e0139200. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139200>
- Kurata, A., Kiyohara, S., Imai, T., Yamasaki-Yashiki, S., Zaima, N., Moriyama, T., Kishimoto, N., Uegaki, K., 2022. Characterization of extracellular vesicles from *Lactiplantibacillus plantarum*. *Sci Rep* 12, 13330. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-17629-7>
- Kusuma, G.D., Barabadi, M., Tan, J.L., Morton, D.A.V., Frith, J.E., Lim, R., 2018. To Protect and to Preserve: Novel Preservation Strategies for Extracellular Vesicles. *Front Pharmacol* 9, 1199. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01199>
- Lactic Acid Bacteria [WWW Document], 2022 . Oxford Academic. URL <https://academic.oup.com/femsre/pages/lactic-acid-bacteria> (accessed 10.7.22).
- Ladero, V., García, P., Alonso, J.C., Suárez, J.E., 2002. Interaction of the Cro repressor with the lysis/lysogeny switch of the *Lactobacillus casei* temperate bacteriophage A2. *J Gen Virol* 83, 2891–2895. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-11-2891>
- Ladero, V., García, P., Alonso, J.C., Suárez, J.E., 1999. A2 cro, the lysogenic cycle repressor, specifically binds to the genetic switch region of *Lactobacillus casei* bacteriophage A2. *Virology* 262, 220–229. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9903>
- Lamas, A., Miranda, J.M., Regal, P., Vázquez, B., Franco, C.M., Cepeda, A., 2018. A comprehensive review of non-*enterica* subspecies of *Salmonella enterica*. *Microbiological Research* 206, 60–73. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.09.010>
- Lappann, M., Otto, A., Becher, D., Vogel, U., 2013. Comparative Proteome Analysis of Spontaneous Outer Membrane Vesicles and Purified Outer Membranes of *Neisseria meningitidis*. *Journal of Bacteriology* 195, 4425–4435. <https://doi.org/10.1128/JB.00625-13>
- Latasa, C., Roux, A., Toledo-Arana, A., Ghigo, J.-M., Gamazo, C., Penadés, J.R., Lasa, I., 2005. BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Mol Microbiol* 58, 1322–1339. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04907.x>
- Lebeaux, D., Ghigo, J.-M., 2012. [Management of biofilm-associated infections: what can we expect from recent research on biofilm lifestyles?]. *Med Sci (Paris)* 28, 727–739. <https://doi.org/10.1051/medsci/2012288015>
- Lebeer, S., Claes, I., Tytgat, H.L.P., Verhoeven, T.L.A., Marien, E., von Ossowski, I., Reunanen, J., Palva, A., Vos, W.M. de, Keersmaecker, S.C.J.D., Vanderleyden, J., 2012. Functional analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG pili in relation to adhesion and immunomodulatory interactions with intestinal epithelial cells. *Appl Environ Microbiol* 78, 185–193. <https://doi.org/10.1128/AEM.06192-11>
- Lebeer, S., Claes, I.J.J., Verhoeven, T.L.A., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S.C.J., 2011. Exopolysaccharides of *Lactobacillus rhamnosus* GG form a protective shield against innate



- immune factors in the intestine. *Microb Biotechnol* 4, 368–374.  
<https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00199.x>
- Ledeboer, N.A., Frye, J.G., McClelland, M., Jones, B.D., 2006. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium requires the Lpf, Pef, and Tafi fimbriae for biofilm formation on HEp-2 tissue culture cells and chicken intestinal epithelium. *Infect Immun* 74, 3156–3169.  
<https://doi.org/10.1128/IAI.01428-05>
- Ledeboer, N.A., Jones, B.D., 2005. Exopolysaccharide sugars contribute to biofilm formation by *Salmonella enterica* serovar typhimurium on HEp-2 cells and chicken intestinal epithelium. *J Bacteriol* 187, 3214–3226. <https://doi.org/10.1128/JB.187.9.3214-3226.2005>
- Lee, B.-H., Wu, S.-C., Shen, T.-L., Hsu, Y.-Y., Chen, C.-H., Hsu, W.-H., 2021. The applications of *Lactobacillus plantarum*-derived extracellular vesicles as a novel natural antibacterial agent for improving quality and safety in tuna fish. *Food Chemistry* 340, 128104.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128104>
- Lee, E.-Y., Choi, D.-S., Kim, K.-P., Gho, Y.S., 2008. Proteomics in gram-negative bacterial outer membrane vesicles. *Mass Spectrom Rev* 27, 535–555. <https://doi.org/10.1002/mas.20175>
- Lee, E.-Y., Choi, D.-Y., Kim, D.-K., Kim, J.-W., Park, J.O., Kim, S., Kim, S.-H., Desiderio, D.M., Kim, Y.-K., Kim, K.-P., Gho, Y.S., 2009. Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: proteomics-based characterization of *Staphylococcus aureus*-derived membrane vesicles. *Proteomics* 9, 5425–5436. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900338>
- Lee, J., Kim, O.Y., Gho, Y.S., 2016. Proteomic profiling of Gram-negative bacterial outer membrane vesicles: Current perspectives. *Prot. Clin. Appl.* 10, 897–909.  
<https://doi.org/10.1002/prca.201600032>
- Lee, J., Lee, E.-Y., Kim, S.-H., Kim, D.-K., Park, K.-S., Kim, K.P., Kim, Y.-K., Roh, T.-Y., Gho, Y.S., 2013. *Staphylococcus aureus* Extracellular Vesicles Carry Biologically Active  $\beta$ -Lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 2589–2595. <https://doi.org/10.1128/AAC.00522-12>
- Lee, J.H., Choi, C.-W., Lee, T., Kim, S.I., Lee, J.-C., Shin, J.-H., 2013. Transcription factor  $\sigma$ B plays an important role in the production of extracellular membrane-derived vesicles in *Listeria monocytogenes*. *PLoS ONE* 8, e73196. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073196>
- Lee, S.H.I., Cappato, L.P., Corassin, C.H., Cruz, A.G., Oliveira, C. a. F., 2016. Effect of peracetic acid on biofilms formed by *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* isolated from dairy plants. *J Dairy Sci* 99, 2384–2390. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10007>
- Lekunberri, I., Subirats, J., Borrego, C.M., Balcázar, J.L., 2017. Exploring the contribution of bacteriophages to antibiotic resistance. *Environ Pollut* 220, 981–984.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.059>
- Leloup, L., Ehrlich, S.D., Zagorec, M., Morel-Deville, F., 1997. Single-crossover integration in the *Lactobacillus sake* chromosome and insertional inactivation of the *ptsI* and *lacL* genes. *Appl Environ Microbiol* 63, 2117–2123. <https://doi.org/10.1128/aem.63.6.2117-2123.1997>
- Leroy, F., De Vuyst, L., 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology* 15, 67–78.  
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.004>
- Letarov, A.V., 2020. History of Early Bacteriophage Research and Emergence of Key Concepts in Virology. *Biochemistry (Mosc)* 85, 1093–1010. <https://doi.org/10.1134/S0006297920090096>
- Lewis, K., 2007. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat Rev Microbiol* 5, 48–56.  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro1557>
- Li, G., Brown, P.J.B., Tang, J.X., Xu, J., Quardokus, E.M., Fuqua, C., Brun, Y.V., 2012. Surface contact stimulates the just-in-time deployment of bacterial adhesins. *Mol Microbiol* 83, 41–51.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07909.x>
- Li, J., Azam, F., Zhang, S., 2016. Outer membrane vesicles containing signalling molecules and active hydrolytic enzymes released by a coral pathogen *Vibrio shilonii* AK1: Characterization of OMVs released by *V. shilonii*. *Environ Microbiol* 18, 3850–3866.  
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.13344>

- Li, M., Lee, K., Hsu, M., Nau, G., Mylonakis, E., Ramratnam, B., 2017. *Lactobacillus*-derived extracellular vesicles enhance host immune responses against vancomycin-resistant enterococci. *BMC Microbiol.* 17, 66. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-0977-7>
- Liangsupree, T., Multia, E., Riekkola, M.-L., 2021. Modern isolation and separation techniques for extracellular vesicles. *J Chromatogr A* 1636, 461773. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461773>
- Liao, S., Klein, M.I., Heim, K.P., Fan, Y., Bitoun, J.P., Ahn, S.-J., Burne, R.A., Koo, H., Brady, L.J., Wen, Z.T., 2014. *Streptococcus mutans* Extracellular DNA Is Upregulated during Growth in Biofilms, Actively Released via Membrane Vesicles, and Influenced by Components of the Protein Secretion Machinery. *J Bacteriol* 196, 2355–2366. <https://doi.org/10.1128/JB.01493-14>
- Lin, D.M., Koskella, B., Lin, H.C., 2017. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World J Gastrointest Pharmacol Ther* 8, 162–173. <https://doi.org/10.4292/wjgpt.v8.i3.162>
- Lin, T.-Y., Weibel, D.B., 2016. Organization and function of anionic phospholipids in bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 100, 4255–4267. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7468-x>
- Lin, Y.P., Thibodeaux, C.H., Peña, J.A., Ferry, G.D., Versalovic, J., 2008. Probiotic *Lactobacillus reuteri* suppress proinflammatory cytokines via c-Jun. *Inflamm Bowel Dis* 14, 1068–1083. <https://doi.org/10.1002/ibd.20448>
- Linares, R., Tan, S., Gounou, C., Brisson, A.R., 2017. Imaging and Quantification of Extracellular Vesicles by Transmission Electron Microscopy. *Methods Mol Biol* 1545, 43–54. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6728-5\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6728-5_4)
- Liu, W., Pang, H., Zhang, H., Cai, Y., 2014. Biodiversity of Lactic Acid Bacteria, in: Zhang, H., Cai, Y. (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Fundamentals and Practice*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 103–203. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-8841-0\\_2](https://doi.org/10.1007/978-94-017-8841-0_2)
- Liu, Y., Alexeeva, S., Bachmann, H., Martínez, J.A.G., Yeremenko, N., Abee, T., Smid, E.J., 2022a. Chronic Release of Tailless Phage Particles from *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 88, 14.
- Liu, Y., Tempelaars, M.H., Boeren, S., Alexeeva, S., Smid, E.J., Abee, T., 2022b. Extracellular vesicle formation in *Lactococcus lactis* is stimulated by prophage-encoded holin–lysin system. *Microbial Biotechnology* 15, 1281–1295. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13972>
- Livshits, M.A., Livshits, M.A., Khomyakova, E., Evtushenko, E.G., Lazarev, V.N., Kulemin, N.A., Semina, S.E., Generozov, E.V., Govorun, V.M., 2015. Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol. *Sci Rep* 5, 17319. <https://doi.org/10.1038/srep17319>
- Lobb, R., Möller, A., 2017. Size Exclusion Chromatography: A Simple and Reliable Method for Exosome Purification. *Methods Mol Biol* 1660, 105–110. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7253-1\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7253-1_9)
- Łobocka, M.B., Rose, D.J., Plunkett, G., Rusin, M., Samojedny, A., Lehnher, H., Yarmolinsky, M.B., Blattner, F.R., 2004. Genome of Bacteriophage P1. *J Bacteriol* 186, 7032–7068. <https://doi.org/10.1128/JB.186.21.7032-7068.2004>
- Lonhienne, T.G.A., Sagulenko, E., Webb, R.I., Lee, K.-C., Franke, J., Devos, D.P., Nouwens, A., Carroll, B.J., Fuerst, J.A., 2010. Endocytosis-like protein uptake in the bacterium *Gemmata obscuriglobus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 12883–12888. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001085107>
- Lu, Z., Breidt, F., Plengvidhya, V., Fleming, H.P., 2003. Bacteriophage Ecology in Commercial Sauerkraut Fermentations. *Appl Environ Microbiol* 69, 3192–3202. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.6.3192-3202.2003>
- Lunde, M., Blatny, J.M., Lillehaug, D., Aastveit, A.H., Nes, I.F., 2003. Use of real-time quantitative PCR for the analysis of phiLC3 prophage stability in lactococci. *Appl Environ Microbiol* 69, 41–48. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.41-48.2003>
- Lwoff, A., 1953. Lysogeny. *Bacteriol Rev* 17, 269–337. <https://doi.org/10.1128/br.17.4.269-337.1953>

- Lyu, N., Knight, R., Robertson, S.Y.T., Dos Santos, A., Zhang, C., Ma, C., Xu, J., Zheng, J., Deng, S.X., 2022. Stability and Function of Extracellular Vesicles Derived from Immortalized Human Corneal Stromal Stem Cells: A Proof of Concept Study. *AAPS J* 25, 8. <https://doi.org/10.1208/s12248-022-00767-1>
- Ma, L., Conover, M., Lu, H., Parsek, M.R., Bayles, K., Wozniak, D.J., 2009. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS Pathog* 5, e1000354. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000354>
- Ma, X., Wang, G., Zhai, Z., Zhou, P., Hao, Y., 2018. Global Transcriptomic Analysis and Function Identification of Malolactic Enzyme Pathway of *Lactobacillus paracasei* L9 in Response to Bile Stress. *Front Microbiol* 9, 1978. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01978>
- Maccelli, A., Carradori, S., Puca, V., Sisto, F., Lanuti, P., Crestoni, M.E., Lasalvia, A., Muraro, R., Bysell, H., Di Sotto, A., Roos, S., Grande, R., 2020. Correlation between the Antimicrobial Activity and Metabolic Profiles of Cell Free Supernatants and Membrane Vesicles Produced by *Lactobacillus reuteri* DSM 17938. *Microorganisms* 8, 1653. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111653>
- MacDonald, I.A., Kuehn, M.J., 2013. Stress-Induced Outer Membrane Vesicle Production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 195, 2971–2981. <https://doi.org/10.1128/JB.02267-12>
- Macho Fernandez, E., Fernandez, E.M., Valenti, V., Rockel, C., Hermann, C., Pot, B., Boneca, I.G., Grangette, C., 2011. Anti-inflammatory capacity of selected lactobacilli in experimental colitis is driven by NOD2-mediated recognition of a specific peptidoglycan-derived muropeptide. *Gut* 60, 1050–1059. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.232918>
- Mack, D.R., Ahrne, S., Hyde, L., Wei, S., Hollingsworth, M.A., 2003. Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. *Gut* 52, 827–833. <https://doi.org/10.1136/gut.52.6.827>
- Mackowiak, P.A., 2013. Recycling Metchnikoff: Probiotics, the Intestinal Microbiome and the Quest for Long Life. *Front Public Health* 1, 52. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2013.00052>
- Madera, C., Monjardín, C., Suárez, J.E., 2004. Milk contamination and resistance to processing conditions determine the fate of *Lactococcus lactis* bacteriophages in dairies. *Appl Environ Microbiol* 70, 7365–7371. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.12.7365-7371.2004>
- Mahony, J., Ainsworth, S., Stockdale, S., van Sinderen, D., 2012. Phages of lactic acid bacteria: the role of genetics in understanding phage-host interactions and their co-evolutionary processes. *Virology* 434, 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.10.008>
- Mahony, J., van Sinderen, D., 2014. Current taxonomy of phages infecting lactic acid bacteria. *Front Microbiol* 5, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00007>
- Majowicz, S.E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F.J., Kirk, M., O'Brien, S.J., Jones, T.F., Fazil, A., Hoekstra, R.M., International Collaboration on Enteric Disease “Burden of Illness” Studies, 2010. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin Infect Dis* 50, 882–889. <https://doi.org/10.1086/650733>
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., Shakhova, V., Grigoriev, I., Lou, Y., Rohksar, D., Lucas, S., Huang, K., Goodstein, D.M., Hawkins, T., Plengvidhya, V., Welker, D., Hughes, J., Goh, Y., Benson, A., Baldwin, K., Lee, J.-H., Díaz-Muñiz, I., Dosti, B., Smeianov, V., Wechter, W., Barabote, R., Lorca, G., Altermann, E., Barrangou, R., Ganesan, B., Xie, Y., Rawsthorne, H., Tamir, D., Parker, C., Breidt, F., Broadbent, J., Hutkins, R., O'Sullivan, D., Steele, J., Unlu, G., Saier, M., Klaenhammer, T., Richardson, P., Kozyavkin, S., Weimer, B., Mills, D., 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 15611–15616. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607117103>
- Makarova, K.S., Koonin, E.V., 2007. Evolutionary Genomics of Lactic Acid Bacteria. *Journal of Bacteriology* 189, 1199–1208. <https://doi.org/10.1128/JB.01351-06>
- Makras, L., Triantafyllou, V., Fayol-Messaoudi, D., Adriany, T., Zoumpopoulou, G., Tsakalidou, E., Servin, A., De Vuyst, L., 2006. Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic

- lactobacilli towards *Salmonella* enterica serovar Typhimurium reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. *Res Microbiol* 157, 241–247. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.09.002>
- Mann, N.H., 2005. The third age of phage. *PLoS Biol* 3, e182. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030182>
- Manning, A.J., Kuehn, M.J., 2011. Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. *BMC Microbiol* 11, 258. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-258>
- Marcó, M.B., Moineau, S., Quiberoni, A., 2012. Bacteriophages and dairy fermentations. *Bacteriophage* 2, 149–158. <https://doi.org/10.4161/bact.21868>
- Maredia, R., Devineni, N., Lentz, P., Dallo, S.F., Yu, J., Guentzel, N., Chambers, J., Arulanandam, B., Haskins, W.E., Weitao, T., 2012. Vesiculation from *Pseudomonas aeruginosa* under SOS. *The Scientific World Journal* 2012, 1–18. <https://doi.org/10.1100/2012/402919>
- Marino, M., Maifreni, M., Baggio, A., Innocente, N., 2018. Inactivation of Foodborne Bacteria Biofilms by Aqueous and Gaseous Ozone. *Front Microbiol* 9, 2024. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02024>
- Martín, R., Miquel, S., Ulmer, J., Langella, P., Bermúdez-Humarán, L.G., 2014. Gut ecosystem: how microbes help us. *Benef Microbes* 5, 219–233. <https://doi.org/10.3920/BM2013.0057>
- Mashburn, L.M., Whiteley, M., 2005. Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. *Nature* 437, 422–425. <https://doi.org/10.1038/nature03925>
- Mashburn-Warren, L., Howe, J., Garidel, P., Richter, W., Steiniger, F., Roessle, M., Brandenburg, K., Whiteley, M., 2008. Interaction of quorum signals with outer membrane lipids: insights into prokaryotic membrane vesicle formation. *Molecular Microbiology* 69, 491–502. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06302.x>
- Maszewska, A., Zygmunt, M., Grzejdzia, I., Różalski, A., 2018. Use of polyvalent bacteriophages to combat biofilm of *Proteus mirabilis* causing catheter-associated urinary tract infections. *J Appl Microbiol* 125, 1253–1265. <https://doi.org/10.1111/jam.14026>
- Mata Forsberg, M., Björkander, S., Pang, Y., Lundqvist, L., Ndi, M., Ott, M., Escibá, I.B., Jaeger, M.-C., Roos, S., Sverremark-Ekström, E., 2019. Extracellular Membrane Vesicles from Lactobacilli Dampen IFN- $\gamma$  Responses in a Monocyte-Dependent Manner. *Sci Rep* 9, 17109. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53576-6>
- Mathelié-Guinlet, M., Asmar, A.T., Collet, J.-F., Dufrêne, Y.F., 2020. Lipoprotein Lpp regulates the mechanical properties of the *E. coli* cell envelope. *Nat Commun* 11, 1789. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15489-1>
- Matsuguchi, T., Takagi, A., Matsuzaki, T., Nagaoka, M., Ishikawa, K., Yokokura, T., Yoshikai, Y., 2003. Lipoteichoic acids from *Lactobacillus* strains elicit strong tumor necrosis factor alpha-inducing activities in macrophages through Toll-like receptor 2. *Clin Diagn Lab Immunol* 10, 259–266. <https://doi.org/10.1128/cdli.10.2.259-266.2003>
- Mazé, A., Boël, G., Zúñiga, M., Bourand, A., Loux, V., Yebra, M.J., Monedero, V., Correia, K., Jacques, N., Beaufils, S., Poncet, S., Joyet, P., Milohanic, E., Casarégola, S., Auffray, Y., Pérez-Martínez, G., Gibrat, J.-F., Zagorec, M., Francke, C., Hartke, A., Deutscher, J., 2010. Complete genome sequence of the probiotic *Lactobacillus casei* strain BL23. *J Bacteriol* 192, 2647–2648. <https://doi.org/10.1128/JB.00076-10>
- McBain, A.J., 2009. Chapter 4: In vitro biofilm models: an overview. *Adv Appl Microbiol* 69, 99–132. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(09\)69004-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(09)69004-3)
- McBroom, A.J., Johnson, A.P., Vemulapalli, S., Kuehn, M.J., 2006. Outer Membrane Vesicle Production by *Escherichia coli* Is Independent of Membrane Instability. *JB* 188, 5385–5392. <https://doi.org/10.1128/JB.00498-06>
- McBroom, A.J., Kuehn, M.J., 2007. Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response: Outer membrane vesicles relieve envelope stress. *Molecular Microbiology* 63, 545–558. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05522.x>

- McConnell, M.A., Tannock, G.W., 1993. A note on lactobacilli and beta-glucuronidase activity in the intestinal contents of mice. *J Appl Bacteriol* 74, 649–651. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb05198.x>
- McFarland, L.V., 2006. Meta-analysis of probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhea and the treatment of *Clostridium difficile* disease. *Am J Gastroenterol* 101, 812–822. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2006.00465.x>
- McGovern, P.E., Zhang, J., Tang, J., Zhang, Z., Hall, G.R., Moreau, R.A., Nuñez, A., Butrym, E.D., Richards, M.P., Wang, C.-S., Cheng, G., Zhao, Z., Wang, C., 2004. Fermented beverages of pre- and proto-historic China. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17593–17598. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407921102>
- McMahon, K.J., Castelli, M.E., Vescovi, E.G., Feldman, M.F., 2012. Biogenesis of Outer Membrane Vesicles in *Serratia marcescens* Is Thermoregulated and Can Be Induced by Activation of the Rcs Phosphorelay System. *Journal of Bacteriology* 194, 3241–3249. <https://doi.org/10.1128/JB.00016-12>
- McMillan, H.M., Kuehn, M.J., 2021. The extracellular vesicle generation paradox: a bacterial point of view. *EMBO J* 40, e108174. <https://doi.org/10.15252/embj.2021108174>
- Mercanti, D.J., Carminati, D., Reinheimer, J.A., Quiberoni, A., 2011. Widely distributed lysogeny in probiotic lactobacilli represents a potentially high risk for the fermentative dairy industry. *Int J Food Microbiol* 144, 503–510. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.009>
- Meroni, G., Panelli, S., Zuccotti, G., Bandi, C., Drago, L., Pistone, D., 2021. Probiotics as Therapeutic Tools against Pathogenic Biofilms: Have We Found the Perfect Weapon? *Microbiology Research* 12, 916–937. <https://doi.org/10.3390/microbiolres12040068>
- Microbiota - MeSH - NCBI [WWW Document], 2022 URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68064307> (accessed 9.2.22).
- Miettinen, M., Lehtonen, A., Julkunen, I., Matikainen, S., 2000. Lactobacilli and Streptococci activate NF-kappa B and STAT signaling pathways in human macrophages. *J Immunol* 164, 3733–3740. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.7.3733>
- Mika, F., Hengge, R., 2013. Small Regulatory RNAs in the Control of Motility and Biofilm Formation in *E. coli* and *Salmonella*. *Int J Mol Sci* 14, 4560–4579. <https://doi.org/10.3390/ijms14034560>
- Mileti, E., Matteoli, G., Iliev, I.D., Rescigno, M., 2009. Comparison of the immunomodulatory properties of three probiotic strains of Lactobacilli using complex culture systems: prediction for in vivo efficacy. *PLoS One* 4, e7056. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007056>
- Minelli, C., Sikora, A., Garcia-Diez, R., Sparnacci, K., Gollwitzer, C., Krumrey, M., Shard, A.G., 2018. Measuring the size and density of nanoparticles by centrifugal sedimentation and flotation. *Anal. Methods* 10, 1725–1732. <https://doi.org/10.1039/C8AY00237A>
- Miyoshi, Y., Saika, A., Nagatake, T., Matsunaga, A., Kunisawa, J., Katakura, Y., Yamasaki-Yashiki, S., 2021. Mechanisms underlying enhanced IgA production in Peyer’s patch cells by membrane vesicles derived from *Lactobacillus sakei*. *Biosci Biotechnol Biochem* 85, 1536–1545. <https://doi.org/10.1093/bbb/zbab065>
- Mizan, M.F.R., Jahid, I.K., Ha, S.-D., 2015. Microbial biofilms in seafood: a food-hygiene challenge. *Food Microbiol* 49, 41–55. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.01.009>
- Mlynek, K.D., Bullock, L.L., Stone, C.J., Curran, L.J., Sadykov, M.R., Bayles, K.W., Brinsmade, S.R., 2020. Genetic and Biochemical Analysis of CodY-Mediated Cell Aggregation in *Staphylococcus aureus* Reveals an Interaction between Extracellular DNA and Polysaccharide in the Extracellular Matrix. *J Bacteriol* 202, e00593-19. <https://doi.org/10.1128/JB.00593-19>
- Moayyedi, P., Ford, A.C., Talley, N.J., Cremonini, F., Foxx-Orenstein, A.E., Brandt, L.J., Quigley, E.M.M., 2010. The efficacy of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: a systematic review. *Gut* 59, 325–332. <https://doi.org/10.1136/gut.2008.167270>
- Mohamadzadeh, M., Pfeiler, E.A., Brown, J.B., Zadeh, M., Gramarossa, M., Managlia, E., Bere, P., Sarraj, B., Khan, M.W., Pakanati, K.C., Ansari, M.J., O’Flaherty, S., Barrett, T., Klaenhammer, T.R., 2011. Regulation of induced colonic inflammation by *Lactobacillus acidophilus* deficient

- in lipoteichoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 Suppl 1, 4623–4630.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1005066107>
- Momen-Heravi, F., Balaj, L., Alian, S., Mantel, P.-Y., Halleck, A.E., Trachtenberg, A.J., Soria, C.E., Oquin, S., Bonebreak, C.M., Saracoglu, E., Skog, J., Kuo, W.P., 2013. Current methods for the isolation of extracellular vesicles. *Biol Chem* 394, 1253–1262. <https://doi.org/10.1515/hsz-2013-0141>
- Monteiro, C., Fang, X., Ahmad, I., Gomelsky, M., Römling, U., 2011. Regulation of biofilm components in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by lytic transglycosylases involved in cell wall turnover. *J Bacteriol* 193, 6443–6451. <https://doi.org/10.1128/JB.00425-11>
- Moon, D.C., Choi, C.H., Lee, J.H., Choi, C.-W., Kim, H.-Y., Park, J.S., Kim, S.I., Lee, J.C., 2012. *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein a modulates the biogenesis of outer membrane vesicles. *J Microbiol.* 50, 155–160. <https://doi.org/10.1007/s12275-012-1589-4>
- Morales-Kastresana, A., Jones, J.C., 2017. Flow Cytometric Analysis of Extracellular Vesicles. *Methods Mol Biol* 1545, 215–225. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6728-5\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6728-5_16)
- Morishita, M., Horita, M., Higuchi, A., Marui, M., Katsumi, H., Yamamoto, A., 2021. Characterizing Different Probiotic-Derived Extracellular Vesicles as a Novel Adjuvant for Immunotherapy. *Mol Pharm* 18, 1080–1092. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.0c01011>
- Morishita, M., Sagayama, R., Yamawaki, Y., Yamaguchi, M., Katsumi, H., Yamamoto, A., 2022. Activation of Host Immune Cells by Probiotic-Derived Extracellular Vesicles via TLR2-Mediated Signaling Pathways. *Biol Pharm Bull* 45, 354–359.  
<https://doi.org/10.1248/bpb.b21-00924>
- Mowat, A.M., Agace, W.W., 2014. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol* 14, 667–685. <https://doi.org/10.1038/nri3738>
- Mozzi, F., 2016. Lactic Acid Bacteria, in: Caballero, B., Finglas, P.M., Toldrá, F. (Eds.), *Encyclopedia of Food and Health*. Academic Press, Oxford, pp. 501–508. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00414-1>
- Mug-Opstelten, D., Witholt, B., 1978. Preferential release of new outer membrane fragments by exponentially growing *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 508, 287–295.  
[https://doi.org/10.1016/0005-2736\(78\)90331-0](https://doi.org/10.1016/0005-2736(78)90331-0)
- Mulcahy, H., Charron-Mazenod, L., Lewenza, S., 2008. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathog* 4, e1000213.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000213>
- Müller, L., Kuhn, T., Koch, M., Fuhrmann, G., 2021. Stimulation of Probiotic Bacteria Induces Release of Membrane Vesicles with Augmented Anti-inflammatory Activity. *ACS Appl Bio Mater* 4, 3739–3748. <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c01136>
- Muñoz-Provencio, D., Rodríguez-Díaz, J., Collado, M.C., Langella, P., Bermúdez-Humarán, L.G., Monedero, V., 2012. Functional Analysis of the *Lactobacillus casei* BL23 Sortases. *Appl Environ Microbiol* 78, 8684–8693. <https://doi.org/10.1128/AEM.02287-12>
- Murga, R., Stewart, P.S., Daly, D., 1995. Quantitative analysis of biofilm thickness variability. *Biotechnol Bioeng* 45, 503–510. <https://doi.org/10.1002/bit.260450607>
- Murphy, K., Park, A.J., Hao, Y., Brewer, D., Lam, J.S., Khursigara, C.M., 2014. Influence of O Polysaccharides on Biofilm Development and Outer Membrane Vesicle Biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology* 196, 1306–1317.  
<https://doi.org/10.1128/JB.01463-13>
- Mushegian, A.R., 2020. Are There 10<sup>31</sup> Virus Particles on Earth, or More, or Fewer? *Journal of Bacteriology* 202, e00052-20. <https://doi.org/10.1128/JB.00052-20>
- Ñahui Palomino, R.A., Vanpouille, C., Laghi, L., Parolin, C., Melikov, K., Backlund, P., Vitali, B., Margolis, L., 2019. Extracellular vesicles from symbiotic vaginal lactobacilli inhibit HIV-1 infection of human tissues. *Nat Commun* 10, 5656. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13468-9>

- Naiim, M., Boualem, A., Ferre, C., Jabloun, M., Jalocha, A., Ravier, P., 2015. Multiangle dynamic light scattering for the improvement of multimodal particle size distribution measurements. *Soft Matter* 11, 28–32. <https://doi.org/10.1039/c4sm01995d>
- Nanda, A.M., Thormann, K., Frunzke, J., 2015. Impact of Spontaneous Prophage Induction on the Fitness of Bacterial Populations and Host-Microbe Interactions. *J. Bacteriol.* 197, 410–419. <https://doi.org/10.1128/JB.02230-14>
- Nanofcm, 2021. FLOW NANOANALYZER. NanoFCM. URL <https://www.nanofcm.com/flow-nanoanalyzer/> (accessed 11.2.22).
- Narvhus, J.A., Axelsson, L., 2003. LACTIC ACID BACTERIA, in: Caballero, B. (Ed.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (Second Edition). Academic Press, Oxford, pp. 3465–3472. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00673-8>
- Nasukawa, T., Sugimoto, R., Uchiyama, J., Takemura-Uchiyama, I., Murakami, H., Fukuda, K., Matsuzaki, S., Sakaguchi, M., 2021. Purification of membrane vesicles from Gram-positive bacteria using flow cytometry, after iodixanol density-gradient ultracentrifugation. *Res Microbiol* 172, 103792. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2020.11.003>
- Nataraj, B.H., Ali, S.A., Behare, P.V., Yadav, H., 2020. Postbiotics-parabiotics: the new horizons in microbial biotherapy and functional foods. *Microb Cell Fact* 19, 168. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01426-w>
- Nauta, A., van Sinderen, D., Karsens, H., Smit, E., Venema, G., Kok, J., 1996. Inducible gene expression mediated by a repressor-operator system isolated from *Lactococcus lactis* bacteriophage r1t. *Mol Microbiol* 19, 1331–1341. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1996.tb02477.x>
- Navarre, W.W., Schneewind, O., 1999. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 174–229. <https://doi.org/10.1128/MMBR.63.1.174-229.1999>
- Nichols, D.S., Russell, N.J., 1996. Fatty acid adaptation in an Antarctic bacterium - changes in primer utilization. *Microbiology (Reading)* 142, 747–754. <https://doi.org/10.1099/00221287-142-4-747>
- NIH Guide: RESEARCH ON MICROBIAL BIOFILMS [WWW Document], 2022 URL <https://grants.nih.gov/grants/guide/pa-files/pa-03-047.html> (accessed 8.12.22).
- Ochoa-Repáraz, J., Mielcarz, D.W., Wang, Y., Begum-Haque, S., Dasgupta, S., Kasper, D.L., Kasper, L.H., 2010. A polysaccharide from the human commensal *Bacteroides fragilis* protects against CNS demyelinating disease. *Mucosal Immunol* 3, 487–495. <https://doi.org/10.1038/mi.2010.29>
- O’Donoghue, E.J., Krachler, A.M., 2016a. Mechanisms of outer membrane vesicle entry into host cells: MicroReview - OMV entry into host cells. *Cellular Microbiology* 18, 1508–1517. <https://doi.org/10.1111/cmi.12655>
- O’Donoghue, E.J., Krachler, A.M., 2016b. Mechanisms of outer membrane vesicle entry into host cells. *Cell. Microbiol.* 18, 1508–1517. <https://doi.org/10.1111/cmi.12655>
- Ojima, Y., Mohanadas, T., Kitamura, K., Nunogami, S., Yajima, R., Taya, M., 2017. Deletion of degQ gene enhances outer membrane vesicle production of *Shewanella oneidensis* cells. *Arch Microbiol* 199, 415–423. <https://doi.org/10.1007/s00203-016-1315-4>
- Olaya-Abril, A., Prados-Rosales, R., McConnell, M.J., Martín-Peña, R., González-Reyes, J.A., Jiménez-Munguía, I., Gómez-Gascón, L., Fernández, J., Luque-García, J.L., García-Lidón, C., Estévez, H., Pachón, J., Obando, I., Casadevall, A., Pirofski, L., Rodríguez-Ortega, M.J., 2014. Characterization of protective extracellular membrane-derived vesicles produced by *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Proteomics* 106, 46–60. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.04.023>
- Olofsson, A., Vallström, A., Petzold, K., Tegtmeyer, N., Schleucher, J., Carlsson, S., Haas, R., Backert, S., Wai, S.N., Gröbner, G., Arnqvist, A., 2010. Biochemical and functional characterization of *Helicobacter pylori* vesicles: *H. pylori* vesicles and properties for adhesion. *Molecular Microbiology* 77, 1539–1555. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07307.x>

- Onbas, T., Osmanagaoglu, O., Kiran, F., 2019. Potential Properties of *Lactobacillus plantarum* F-10 as a Bio-control Strategy for Wound Infections. *Probiotics Antimicrob Proteins* 11, 1110–1123. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9486-8>
- Orench-Rivera, N., Kuehn, M.J., 2016. Environmentally controlled bacterial vesicle-mediated export. *Cell. Microbiol.* 18, 1525–1536. <https://doi.org/10.1111/cmi.12676>
- Osaili, T.M., Alaboudi, A.R., Nesiari, E.A., 2011. Prevalence of *Listeria* spp. and antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from raw chicken and ready-to-eat chicken products in Jordan. *Food Control* 22, 586–590. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.10.008>
- Osono, E., Honda, K., Inoue, Y., Ichimura, K., Kamano, C., Akimoto, T., Kawamoto, S., Norose, Y., Takaku, S., Morita, R., 2021. Sodium Hypochlorite is Effective against Biofilms in Dialysis Equipment. *Biocontrol Sci* 26, 1–7. <https://doi.org/10.4265/bio.26.1>
- Pabst, O., Izcue, A., 2022. Secretory IgA: controlling the gut microbiota. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 19, 149–150. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00563-w>
- Paganini, C., Hettich, B., Kopp, M.R.G., Eördögh, A., Capasso Palmiero, U., Adamo, G., Touzet, N., Manno, M., Bongiovanni, A., Rivera-Fuentes, P., Leroux, J.-C., Arosio, P., 2022. Rapid Characterization and Quantification of Extracellular Vesicles by Fluorescence-Based Microfluidic Diffusion Sizing. *Adv Healthc Mater* 11, e2100021. <https://doi.org/10.1002/adhm.202100021>
- Palsdottir, H., Remis, J.P., Schaudinn, C., O’Toole, E., Lux, R., Shi, W., McDonald, K.L., Costerton, J.W., Auer, M., 2009. Three-Dimensional Macromolecular Organization of Cryofixed *Myxococcus xanthus* Biofilms as Revealed by Electron Microscopic Tomography. *J Bacteriol* 191, 2077–2082. <https://doi.org/10.1128/JB.01333-08>
- Palud, A., Scornec, H., Cavin, J.-F., Licandro, H., 2018. New Genes Involved in Mild Stress Response Identified by Transposon Mutagenesis in *Lactobacillus paracasei*. *Front Microbiol* 9, 535. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00535>
- Panigrahi, P., Parida, S., Nanda, N.C., Satpathy, R., Pradhan, L., Chandel, D.S., Baccaglini, L., Mohapatra, A., Mohapatra, S.S., Misra, P.R., Chaudhry, R., Chen, H.H., Johnson, J.A., Morris, J.G., Paneth, N., Gewolb, I.H., 2017. A randomized synbiotic trial to prevent sepsis among infants in rural India. *Nature* 548, 407–412. <https://doi.org/10.1038/nature23480>
- Park, A.J., Surette, M.D., Khursigara, C.M., 2014. Antimicrobial targets localize to the extracellular vesicle-associated proteome of *Pseudomonas aeruginosa* grown in a biofilm. *Front Microbiol* 5, 464. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00464>
- Park, J.-Y., Choi, J., Lee, Y., Lee, J.-E., Lee, E.-H., Kwon, H.-J., Yang, J., Jeong, B.-R., Kim, Y.-K., Han, P.-L., 2017. Metagenome Analysis of Bodily Microbiota in a Mouse Model of Alzheimer Disease Using Bacteria-derived Membrane Vesicles in Blood. *Exp Neurobiol* 26, 369–379. <https://doi.org/10.5607/en.2017.26.6.369>
- Parmanand, B.A., Kellingray, L., Le Gall, G., Basit, A.W., Fairweather-Tait, S., Narbad, A., 2019. A decrease in iron availability to human gut microbiome reduces the growth of potentially pathogenic gut bacteria; an in vitro colonic fermentation study. *J Nutr Biochem* 67, 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.01.010>
- Pelto, L., Isolauri, E., Lilius, E.M., Nuutila, J., Salminen, S., 1998. Probiotic bacteria down-regulate the milk-induced inflammatory response in milk-hypersensitive subjects but have an immunostimulatory effect in healthy subjects. *Clin Exp Allergy* 28, 1474–1479. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.1998.00449.x>
- Penna, T.C., Mazzola, P.G., Silva Martins, A.M., 2001. The efficacy of chemical agents in cleaning and disinfection programs. *BMC Infect Dis* 1, 16. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-1-16>
- Perez Vidakovics, M.L.A., Jendholm, J., Mörgelin, M., Månsson, A., Larsson, C., Cardell, L.-O., Riesbeck, K., 2010. B Cell Activation by Outer Membrane Vesicles—A Novel Virulence Mechanism. *PLoS Pathog* 6, e1000724. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000724>



- Pérez-Cruz, C., Briansó, F., Sonnleitner, E., Bläsi, U., Mercadé, E., 2021. RNA release *via* membrane vesicles in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 is associated with the growth phase. *Environ Microbiol* 23, 5030–5041. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15436>
- Pérez-Cruz, C., Carrión, O., Delgado, L., Martínez, G., López-Iglesias, C., Mercade, E., 2013. New Type of Outer Membrane Vesicle Produced by the Gram-Negative Bacterium *Shewanella vesiculosa* M7<sup>T</sup>: Implications for DNA Content. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 1874–1881. <https://doi.org/10.1128/AEM.03657-12>
- Pérez-Cruz, C., Delgado, L., López-Iglesias, C., Mercade, E., 2015. Outer-Inner Membrane Vesicles Naturally Secreted by Gram-Negative Pathogenic Bacteria. *PLoS ONE* 10, e0116896. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116896>
- Petrova, O.E., Sauer, K., 2016. Escaping the biofilm in more than one way: desorption, detachment or dispersion. *Curr Opin Microbiol* 30, 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.01.004>
- Pierson, T., Matrakas, D., Taylor, Y.U., Manyam, G., Morozov, V.N., Zhou, W., van Hoek, M.L., 2011. Proteomic characterization and functional analysis of outer membrane vesicles of *Francisella novicida* suggests possible role in virulence and use as a vaccine. *J Proteome Res* 10, 954–967. <https://doi.org/10.1021/pr1009756>
- Pońska, M., Sokołowska, B., 2019. Bacteriophages—a new hope or a huge problem in the food industry. *AIMS Microbiol* 5, 324–346. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2019.4.324>
- Pollacka, J.H., 1992a. D-Alanyl-lipoteichoic acid in *Lactobacillus casei*: secretion of vesicles in response to benzylpenicillin. *Journal of General Microbiology* 11.
- Pollacka, J.H., 1992b. D-Alanyl-lipoteichoic acid in *Lactobacillus casei*: secretion of vesicles in response to benzylpenicillin. *Journal of General Microbiology* 11.
- Pospíšil, J., Vítovská, D., Kofroňová, O., Muchová, K., Šanderová, H., Hubálek, M., Šiková, M., Modrák, M., Benada, O., Barák, I., Krásný, L., 2020. Bacterial nanotubes as a manifestation of cell death. *Nat Commun* 11, 4963. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18800-2>
- Potera, C., 1999. Forging a link between biofilms and disease. *Science* 283, 1837, 1839. <https://doi.org/10.1126/science.283.5409.1837>
- Prados-Rosales, R., Baena, A., Martínez, L.R., Luque-García, J., Kalscheuer, R., Veeraraghavan, U., Camara, C., Nosanchuk, J.D., Besra, G.S., Chen, B., Jimenez, J., Glatman-Freedman, A., Jacobs, W.R., Porcelli, S.A., Casadevall, A., 2011. Mycobacteria release active membrane vesicles that modulate immune responses in a TLR2-dependent manner in mice. *J. Clin. Invest.* 121, 1471–1483. <https://doi.org/10.1172/JCI44261>
- Prados-Rosales, Rafael, Brown, L., Casadevall, A., Montalvo-Quirós, S., Luque-García, J.L., 2014. Isolation and identification of membrane vesicle-associated proteins in Gram-positive bacteria and mycobacteria. *MethodsX* 1, 124–129. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2014.08.001>
- Prados-Rosales, R., Weinrick, B.C., Pique, D.G., Jacobs, W.R., Casadevall, A., Rodriguez, G.M., 2014. Role for *Mycobacterium tuberculosis* Membrane Vesicles in Iron Acquisition. *Journal of Bacteriology* 196, 1250–1256. <https://doi.org/10.1128/JB.01090-13>
- Price, J.E., Chapman, M.R., 2018. Phaged and confused by biofilm matrix. *Nat Microbiol* 3, 2–3. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0078-2>
- Ptashne, M., 2006. Lambda's switch: lessons from a module swap. *Curr Biol* 16, R459–462. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.05.037>
- Puca, V., Ercolino, E., Celia, C., Bologna, G., Di Marzio, L., Mincione, G., Marchisio, M., Miscia, S., Muraro, R., Lanuti, P., Grande, R., 2019. Detection and Quantification of eDNA-Associated Bacterial Membrane Vesicles by Flow Cytometry. *Int J Mol Sci* 20, E5307. <https://doi.org/10.3390/ijms20215307>
- Pujato, S.A., Quiberoni, A., Mercanti, D.J., 2019. Bacteriophages on dairy foods. *J Appl Microbiol* 126, 14–30. <https://doi.org/10.1111/jam.14062>

- Qin, C., Zhang, Z., Wang, Y., Li, S., Ran, C., Hu, J., Xie, Y., Li, W., Zhou, Z., 2017. EPSP of *L. casei* BL23 Protected against the Infection Caused by *Aeromonas veronii* via Enhancement of Immune Response in Zebrafish. *Front Microbiol* 8, 2406. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02406>
- Qin, Z., Lin, W., Zhu, S., Franco, A.T., Liu, J., 2017. Imaging the Motility and Chemotaxis Machineries in *Helicobacter pylori* by Cryo-Electron Tomography. *J Bacteriol* 199, e00695-16, e00695-16. <https://doi.org/10.1128/JB.00695-16>
- Quiberoni, A., Moineau, S., Rousseau, G.M., Reinheimer, J., Ackermann, H.-W., 2010. *Streptococcus thermophilus* bacteriophages. *International Dairy Journal* 20, 657–664. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.03.012>
- Rakoff-Nahoum, S., Coyne, M.J., Comstock, L.E., 2014. An Ecological Network of Polysaccharide Utilization among Human Intestinal Symbionts. *Current Biology* 24, 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.10.077>
- Rappé, M.S., Giovannoni, S.J., 2003. The uncultured microbial majority. *Annu Rev Microbiol* 57, 369–394. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090759>
- Remis, J.P., Wei, D., Gorur, A., Zemla, M., Haraga, J., Allen, S., Witkowska, H.E., Costerton, J.W., Berleman, J.E., Auer, M., 2014. Bacterial social networks: structure and composition of *Myxococcus xanthus* outer membrane vesicle chains: Membrane vesicle chains and membrane network of *M. xanthus*. *Environ Microbiol* 16, 598–610. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12187>
- Renelli, M., Matias, V., Lo, R.Y., Beveridge, T.J., 2004. DNA-containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential. *Microbiology* 150, 2161–2169. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26841-0>
- Resch, U., Tsatsaronis, J.A., Le Rhun, A., Stübiger, G., Rohde, M., Kasvandik, S., Holzmeister, S., Tinnfeld, P., Wai, S.N., Charpentier, E., 2016. A Two-Component Regulatory System Impacts Extracellular Membrane-Derived Vesicle Production in Group A *Streptococcus*. *mBio* 7, e00207-16, /mbio/7/6/e00207-16.atom. <https://doi.org/10.1128/mBio.00207-16>
- Rezaei Javan, R., Ramos-Sevillano, E., Akter, A., Brown, J., Brueggemann, A.B., 2019. Prophages and satellite prophages are widespread in *Streptococcus* and may play a role in pneumococcal pathogenesis. *Nat Commun* 10, 4852. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12825-y>
- Rieu, A., Aoudia, N., Jegou, G., Chluba, J., Yousfi, N., Briandet, R., Deschamps, J., Gasquet, B., Monedero, V., Garrido, C., Guzzo, J., 2014. The biofilm mode of life boosts the anti-inflammatory properties of *Lactobacillus*: Immunomodulation by *Lactobacillus* biofilms. *Cell Microbiol* 16, 1836–1853. <https://doi.org/10.1111/cmi.12331>
- Rijkers, G.T., de Vos, W.M., Brummer, R.-J., Morelli, L., Corthier, G., Marteau, P., 2011. Health benefits and health claims of probiotics: bridging science and marketing. *Br J Nutr* 106, 1291–1296. <https://doi.org/10.1017/S000711451100287X>
- Rivera, J., Cordero, R.J.B., Nakouzi, A.S., Frases, S., Nicola, A., Casadevall, A., 2010. *Bacillus anthracis* produces membrane-derived vesicles containing biologically active toxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 19002–19007. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008843107>
- Robinson, A., van Oijen, A.M., 2013. Bacterial replication, transcription and translation: mechanistic insights from single-molecule biochemical studies. *Nat Rev Microbiol* 11, 303–315. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2994>
- Rochat, T., Bermúdez-Humarán, L., Gratadoux, J.-J., Fourage, C., Hoebler, C., Corthier, G., Langella, P., 2007. Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus casei* BL23 producing or not a manganese-dependant catalase on DSS-induced colitis in mice. *Microb Cell Fact* 6, 22. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-6-22>
- Roden, J.A., Wells, D.H., Chomel, B.B., Kasten, R.W., Koehler, J.E., 2012. Hemin Binding Protein C Is Found in Outer Membrane Vesicles and Protects *Bartonella henselae* against Toxic Concentrations of Hemin. *Infect. Immun.* 80, 929–942. <https://doi.org/10.1128/IAI.05769-11>
- Roessler, A., Friedrich, U., Vogelsang, H., Bauer, A., Kaatz, M., Hipler, U.C., Schmidt, I., Jahreis, G., 2008. The immune system in healthy adults and patients with atopic dermatitis seems to be

- affected differently by a probiotic intervention. *Clin Exp Allergy* 38, 93–102.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2007.02876.x>
- Rogers, J., Dowsett, A.B., Dennis, P.J., Lee, J.V., Keevil, C.W., 1994. Influence of Plumbing Materials on Biofilm Formation and Growth of *Legionella pneumophila* in Potable Water Systems. *Appl Environ Microbiol* 60, 1842–1851. <https://doi.org/10.1128/aem.60.6.1842-1851.1994>
- Roier, S., Zingl, F., Cakar, F., Schild, S., 2016a. Bacterial outer membrane vesicle biogenesis: a new mechanism and its implications. *Microbial Cell* 3, 257–259.  
<https://doi.org/10.15698/mic2016.06.508>
- Roier, S., Zingl, F.G., Cakar, F., Durakovic, S., Kohl, P., Eichmann, T.O., Klug, L., Gadermaier, B., Weinzerl, K., Prassl, R., Lass, A., Daum, G., Reidl, J., Feldman, M.F., Schild, S., 2016b. A novel mechanism for the biogenesis of outer membrane vesicles in Gram-negative bacteria. *Nat Commun* 7, 10515. <https://doi.org/10.1038/ncomms10515>
- Römling, U., Bian, Z., Hammar, M., Sierralta, W.D., Normark, S., 1998. Curli fibers are highly conserved between *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* with respect to operon structure and regulation. *J Bacteriol* 180, 722–731. <https://doi.org/10.1128/JB.180.3.722-731.1998>
- Römling, U., Rohde, M., 1999. Flagella modulate the multicellular behavior of *Salmonella typhimurium* on the community level. *FEMS Microbiol Lett* 180, 91–102.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb08782.x>
- Roos, S., Engstrand, L., Jonsson, H., 2005. *Lactobacillus gastricus* sp. nov., *Lactobacillus antri* sp. nov., *Lactobacillus kalixensis* sp. nov. and *Lactobacillus ultunensis* sp. nov., isolated from human stomach mucosa. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 77–82. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.63083-0>
- Round, J.L., Lee, S.M., Li, J., Tran, G., Jabri, B., Chatila, T.A., Mazmanian, S.K., 2011. The Toll-like receptor pathway establishes commensal gut colonization. *Science* 332, 974–977.  
<https://doi.org/10.1126/science.1206095>
- Sabra, W., Lünsdorf, H., Zeng, A.-P., 2003. Alterations in the formation of lipopolysaccharide and membrane vesicles on the surface of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 under oxygen stress conditions. *Microbiology (Reading)* 149, 2789–2795. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26443-0>
- Sadowska, B., Walencka, E., Wieckowska-Szakiel, M., Różalska, B., 2010. Bacteria competing with the adhesion and biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *Folia Microbiol (Praha)* 55, 497–501. <https://doi.org/10.1007/s12223-010-0082-x>
- Sahu, P.K., Iyer, P.S., Oak, A.M., Pardesi, K.R., Chopade, B.A., 2012. Characterization of eDNA from the Clinical Strain *Acinetobacter baumannii* AIIIMS 7 and Its Role in Biofilm Formation. *The Scientific World Journal* 2012, 1–10. <https://doi.org/10.1100/2012/973436>
- Saïda, F., Uzan, M., Odaert, B., Bontems, F., 2006. Expression of highly toxic genes in *E. coli*: special strategies and genetic tools. *Curr Protein Pept Sci* 7, 47–56.  
<https://doi.org/10.2174/138920306775474095>
- Saldanha, L.G., 2008. US Food and Drug Administration regulations governing label claims for food products, including probiotics. *Clin Infect Dis* 46 Suppl 2, S119-121; discussion S144-151.  
<https://doi.org/10.1086/523328>
- Salminen, M.K., Rautelin, H., Tynkkynen, S., Poussa, T., Saxelin, M., Valtonen, V., Järvinen, A., 2006. *Lactobacillus* bacteremia, species identification, and antimicrobial susceptibility of 85 blood isolates. *Clin Infect Dis* 42, e35-44. <https://doi.org/10.1086/500214>
- Salminen, M.K., Tynkkynen, S., Rautelin, H., Saxelin, M., Vaara, M., Ruutu, P., Sarna, S., Valtonen, V., Järvinen, A., 2002. *Lactobacillus* bacteremia during a rapid increase in probiotic use of *Lactobacillus rhamnosus* GG in Finland. *Clin Infect Dis* 35, 1155–1160.  
<https://doi.org/10.1086/342912>
- Salmond, G.P.C., Fineran, P.C., 2015. A century of the phage: past, present and future. *Nat Rev Microbiol* 13, 777–786. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3564>
- Salveti, E., Torriani, S., Felis, G.E., 2012. The Genus *Lactobacillus*: A Taxonomic Update. *Probiotics Antimicrob Proteins* 4, 217–226. <https://doi.org/10.1007/s12602-012-9117-8>

- Samson, J.E., Moineau, S., 2013. Bacteriophages in food fermentations: new frontiers in a continuous arms race. *Annu Rev Food Sci Technol* 4, 347–368. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030212-182541>
- Samsonov, R., Shtam, T., Burdakov, V., Glotov, A., Tsyrlina, E., Berstein, L., Nosov, A., Evtushenko, V., Filatov, M., Malek, A., 2016. Lectin-induced agglutination method of urinary exosomes isolation followed by mi-RNA analysis: Application for prostate cancer diagnostic. *Prostate* 76, 68–79. <https://doi.org/10.1002/pros.23101>
- Sanders, M.E., Merenstein, D.J., Reid, G., Gibson, G.R., Rastall, R.A., 2019. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 16, 605–616. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0173-3>
- Sarkar, A., Lehto, S.M., Harty, S., Dinan, T.G., Cryan, J.F., Burnet, P.W.J., 2016. Psychobiotics and the Manipulation of Bacteria-Gut-Brain Signals. *Trends Neurosci* 39, 763–781. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.09.002>
- Sauer, K., Cullen, M.C., Rickard, A.H., Zeef, L. a. H., Davies, D.G., Gilbert, P., 2004. Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. *J Bacteriol* 186, 7312–7326. <https://doi.org/10.1128/JB.186.21.7312-7326.2004>
- Sawadogo-Lingani, H., Lei, V., Diawara, B., Nielsen, D.S., Møller, P.L., Traoré, A.S., Jakobsen, M., 2007. The biodiversity of predominant lactic acid bacteria in dolo and pito wort for the production of sorghum beer. *J Appl Microbiol* 103, 765–777. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03306.x>
- Sazawal, S., Hiremath, G., Dhingra, U., Malik, P., Deb, S., Black, R.E., 2006. Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials. *Lancet Infect Dis* 6, 374–382. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70495-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70495-9)
- Schaar, V., Nordström, T., Mörgelin, M., Riesbeck, K., 2011. *Moraxella catarrhalis* Outer Membrane Vesicles Carry  $\beta$ -Lactamase and Promote Survival of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by Inactivating Amoxicillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 3845–3853. <https://doi.org/10.1128/AAC.01772-10>
- Schaefer, L., Auchtung, T.A., Hermans, K.E., Whitehead, D., Borhan, B., Britton, R.A., 2010. The antimicrobial compound reuterin (3-hydroxypropionaldehyde) induces oxidative stress via interaction with thiol groups. *Microbiology (Reading)* 156, 1589–1599. <https://doi.org/10.1099/mic.0.035642-0>
- Schertzer, J.W., Whiteley, M., 2012. A Bilayer-Couple Model of Bacterial Outer Membrane Vesicle Biogenesis. *mBio* 3, e00297-11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00297-11>
- Schlatterer, K., Beck, C., Hanzelmann, D., Lebtig, M., Fehrenbacher, B., Schaller, M., Ebner, P., Nega, M., Otto, M., Kretschmer, D., Peschel, A., 2018. The Mechanism behind Bacterial Lipoprotein Release: Phenol-Soluble Modulins Mediate Toll-Like Receptor 2 Activation via Extracellular Vesicle Release from *Staphylococcus aureus*. *mBio* 9, e01851-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.01851-18>
- Schooling, S.R., Beveridge, T.J., 2006. Membrane Vesicles: an Overlooked Component of the Matrices of Biofilms. *Journal of Bacteriology* 188, 5945–5957. <https://doi.org/10.1128/JB.00257-06>
- Schooling, S.R., Huble, A., Beveridge, T.J., 2009. Interactions of DNA with Biofilm-Derived Membrane Vesicles. *Journal of Bacteriology* 191, 4097–4102. <https://doi.org/10.1128/JB.00717-08>
- Schütz, H., Radler, F., 1984. Anaerobic Reduction of Glycerol to Propanediol-1.3 by *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri*. *Systematic and Applied Microbiology* 5, 169–178. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(84\)80018-1](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(84)80018-1)
- Schwechheimer, C., Kuehn, M.J., 2015. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 605–619. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3525>
- Schwechheimer, C., Kuehn, M.J., 2013. Synthetic Effect between Envelope Stress and Lack of Outer Membrane Vesicle Production in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 195, 4161–4173. <https://doi.org/10.1128/JB.02192-12>

- Schwechheimer, C., Kulp, A., Kuehn, M.J., 2014. Modulation of bacterial outer membrane vesicle production by envelope structure and content. *BMC Microbiol* 14, 324. <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0324-1>
- Schwechheimer, C., Rodriguez, D.L., Kuehn, M.J., 2015. NlpI-mediated modulation of outer membrane vesicle production through peptidoglycan dynamics in *Escherichia coli*. *MicrobiologyOpen* 4, 375–389. <https://doi.org/10.1002/mbo3.244>
- Senpuku, H., Nakamura, T., Iwabuchi, Y., Hirayama, S., Nakao, R., Ohnishi, M., 2019. Effects of Complex DNA and MVs with GTF Extracted from *Streptococcus mutans* on the Oral Biofilm. *Molecules* 24, E3131. <https://doi.org/10.3390/molecules24173131>
- Seo, M.K., Park, E.J., Ko, S.Y., Choi, E.W., Kim, S., 2018. Therapeutic effects of kefir grain *Lactobacillus*-derived extracellular vesicles in mice with 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced inflammatory bowel disease. *J Dairy Sci* 101, 8662–8671. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15014>
- Servin, A.L., 2004. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev* 28, 405–440. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.01.003>
- Sharma, M., Anand, S.K., 2002. Characterization of constitutive microflora of biofilms in dairy processing lines. *Food Microbiology* 19, 627–636. <https://doi.org/10.1006/fmic.2002.0472>
- Sharma, S., LeClaire, M., Gimzewski, J.K., 2018. Ascent of atomic force microscopy as a nanoanalytical tool for exosomes and other extracellular vesicles. *Nanotechnology* 29, 132001. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/aaab06>
- Shen, Y., Giardino Torchia, M.L., Lawson, G.W., Karp, C.L., Ashwell, J.D., Mazmanian, S.K., 2012. Outer membrane vesicles of a human commensal mediate immune regulation and disease protection. *Cell Host Microbe* 12, 509–520. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.08.004>
- Shi, Y., Meng, L., Zhang, C., Zhang, F., Fang, Y., 2021. Extracellular vesicles of *Lactocaseibacillus paracasei* PC-H1 induce colorectal cancer cells apoptosis via PDK1/AKT/Bcl-2 signaling pathway. *Microbiol Res* 255, 126921. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126921>
- Shibata, S., Visick, K.L., 2012. Sensor kinase RscS induces the production of antigenically distinct outer membrane vesicles that depend on the symbiosis polysaccharide locus in *Vibrio fischeri*. *J Bacteriol* 194, 185–194. <https://doi.org/10.1128/JB.05926-11>
- Shin, C.M., Choi, Y.J., Lee, D.H., Moon, J.S., Kim, T.-Y., Kim, Y.-K., Lee, W.-H., Yoon, H., Park, Y.S., Kim, N., 2021. Validity and safety of ID-JPL934 in lower gastrointestinal symptom improvement. *Sci Rep* 11, 13046. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92007-3>
- Shiraishi, T., Yokota, S., Sato, Y., Ito, T., Fukiya, S., Yamamoto, S., Sato, T., Yokota, A., 2018. Lipoteichoic acids are embedded in cell walls during logarithmic phase, but exposed on membrane vesicles in *Lactobacillus gasseri* JCM 1131T. *Benef Microbes* 9, 653–662. <https://doi.org/10.3920/BM2017.0124>
- Shrestha, L., Fan, H.-M., Tao, H.-R., Huang, J.-D., 2022. Recent Strategies to Combat Biofilms Using Antimicrobial Agents and Therapeutic Approaches. *Pathogens* 11, 292. <https://doi.org/10.3390/pathogens11030292>
- Simm, R., Ahmad, I., Rhen, M., Le Guyon, S., Römling, U., 2014. Regulation of biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Future Microbiol* 9, 1261–1282. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.88>
- Simonsen, J.B., 2017. What Are We Looking At? Extracellular Vesicles, Lipoproteins, or Both? *Circ Res* 121, 920–922. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311767>
- Singh, R., Ray, P., Das, A., Sharma, M., 2010. Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J Antimicrob Chemother* 65, 1955–1958. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq257>
- Song, T., Mika, F., Lindmark, B., Liu, Z., Schild, S., Bishop, A., Zhu, J., Camilli, A., Johansson, J., Vogel, J., Wai, S.N., 2008. A new *Vibrio cholerae* sRNA modulates colonization and affects release of outer membrane vesicles: VrrA controls OmpA expression and virulence. *Molecular Microbiology* 70, 100–111. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06392.x>

- Sonntag, I., Schwarz, H., Hirota, Y., Henning, U., 1978. Cell envelope and shape of *Escherichia coli*: multiple mutants missing the outer membrane lipoprotein and other major outer membrane proteins. *Journal of Bacteriology* 136, 280–285. <https://doi.org/10.1128/JB.136.1.280-285.1978>
- Srey, S., Jahid, I.K., Ha, S.-D., 2013. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control* 31, 572–585. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.001>
- Stetefeld, J., McKenna, S.A., Patel, T.R., 2016. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophys Rev* 8, 409–427. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6>
- St-Pierre, F., Endy, D., 2008. Determination of cell fate selection during phage lambda infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 20705–20710. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808831105>
- Strahl, H., Errington, J., 2017. Bacterial Membranes: Structure, Domains, and Function. *Annu. Rev. Microbiol.* 71, 519–538. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-102215-095630>
- Su, P.-T., Liao, C.-T., Roan, J.-R., Wang, S.-H., Chiou, A., Syu, W.-J., 2012. Bacterial colony from two-dimensional division to three-dimensional development. *PLoS One* 7, e48098. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048098>
- Summers, W.C., 2001. Bacteriophage therapy. *Annu Rev Microbiol* 55, 437–451. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.437>
- Suwal, S., Wu, Q., Liu, W., Liu, Q., Sun, H., Liang, M., Gao, J., Zhang, B., Kou, Y., Liu, Z., Wei, Y., Wang, Y., Zheng, K., 2018. The Probiotic Effectiveness in Preventing Experimental Colitis Is Correlated With Host Gut Microbiota. *Front Microbiol* 9, 2675. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02675>
- Suzuki, H., Nishimura, Y., Yasuda, S., Nishimura, A., Yamada, M., Hirota, Y., 1978. Murein-lipoprotein of *Escherichia coli*: A protein involved in the stabilization of bacterial cell envelope. *Molec. Gen. Genet.* 167, 1–9. <https://doi.org/10.1007/BF00270315>
- Takahashi, C., Sato, M., Sato, C., 2021. Biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* imaged using atmospheric scanning electron microscopy. *Anal Bioanal Chem* 413, 7549–7558. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03720-x>
- Tamime, A.Y., Saarela, M., Søndergaard, A.K., Mistry, V.V., Shah, N.P., 2006. Production and Maintenance of Viability of Probiotic Micro-Organisms in Dairy Products, in: *Probiotic Dairy Products*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 39–72. <https://doi.org/10.1002/9780470995785.ch3>
- Tan, L., Fu, J., Feng, F., Liu, X., Cui, Z., Li, B., Han, Y., Zheng, Y., Yeung, K.W.K., Li, Z., Zhu, S., Liang, Y., Feng, X., Wang, X., Wu, S., 2020. Engineered probiotics biofilm enhances osseointegration via immunoregulation and anti-infection. *Sci Adv* 6, eaba5723. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aba5723>
- Tan, T.T., Mörgelin, M., Forsgren, A., Riesbeck, K., 2007. *Haemophilus influenzae* Survival during Complement-Mediated Attacks Is Promoted by *Moraxella catarrhalis* Outer Membrane Vesicles. *J INFECT DIS* 195, 1661–1670. <https://doi.org/10.1086/517611>
- Taş, N., de Jong, A.E., Li, Y., Trubl, G., Xue, Y., Dove, N.C., 2021. Metagenomic tools in microbial ecology research. *Curr Opin Biotechnol* 67, 184–191. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.01.019>
- Tashiro, Y., Ichikawa, S., Nakajima-Kambe, T., Uchiyama, H., Nomura, N., 2010a. *Pseudomonas* Quinolone Signal Affects Membrane Vesicle Production in not only Gram-Negative but also Gram-Positive Bacteria. *Microbes Environ.* 25, 120–125. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME09182>
- Tashiro, Y., Ichikawa, S., Shimizu, M., Toyofuku, M., Takaya, N., Nakajima-Kambe, T., Uchiyama, H., Nomura, N., 2010b. Variation of Physicochemical Properties and Cell Association Activity of Membrane Vesicles with Growth Phase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 76, 3732–3739. <https://doi.org/10.1128/AEM.02794-09>
- Tashiro, Y., Inagaki, A., Shimizu, M., Ichikawa, S., Takaya, N., Nakajima-Kambe, T., Uchiyama, H., Nomura, N., 2011. Characterization of Phospholipids in Membrane Vesicles Derived from

- Pseudomonas aeruginosa*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 75, 605–607. <https://doi.org/10.1271/bbb.100754>
- Tashiro, Y., Sakai, R., Toyofuku, M., Sawada, I., Nakajima-Kambe, T., Uchiyama, H., Nomura, N., 2009. Outer Membrane Machinery and Alginate Synthesis Regulators Control Membrane Vesicle Production in *Pseudomonas aeruginosa*. JB 191, 7509–7519. <https://doi.org/10.1128/JB.00722-09>
- Teixeira, L.D., Harrison, N.A., da Silva, D.R., Mathews, C.E., Gonzalez, C.F., Lorca, G.L., 2022. Nanovesicles From *Lactobacillus johnsonii* N6.2 Reduce Apoptosis in Human Beta Cells by Promoting AHR Translocation and IL10 Secretion. Front Immunol 13, 899413. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.899413>
- Tena, D., Martínez, N.M., Losa, C., Fernández, C., Medina, M.J., Sáez-Nieto, J.A., 2013. Acute acalculous cholecystitis complicated with peritonitis caused by *Lactobacillus plantarum*. Diagn Microbiol Infect Dis 76, 510–512. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.03.018>
- Terejánszky, P., Papp, S., Berényi, S., Gyurcsányi, R.E., 2019. Resistive Pulse Sensing as a High-Resolution Nanoparticle Sizing Method: A Comparative Study. Particle & Particle Systems Characterization 36, 1800543. <https://doi.org/10.1002/ppsc.201800543>
- Thomas, C.M., Versalovic, J., 2010. Probiotics-host communication: Modulation of signaling pathways in the intestine. Gut Microbes 1, 148–163. <https://doi.org/10.4161/gmic.1.3.11712>
- Thomason, L.C., Morrill, K., Murray, G., Court, C., Shafer, B., Schneider, T.D., Court, D.L., 2019. Elements in the  $\lambda$  immunity region regulate phage development: beyond the “Genetic Switch.” Mol Microbiol 112, 1798–1813. <https://doi.org/10.1111/mmi.14394>
- Thormann, K.M., Saville, R.M., Shukla, S., Spormann, A.M., 2005. Induction of rapid detachment in *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms. J Bacteriol 187, 1014–1021. <https://doi.org/10.1128/JB.187.3.1014-1021.2005>
- Tjalsma, H., Antelmann, H., Jongbloed, J.D.H., Braun, P.G., Darmon, E., Dorenbos, R., Dubois, J.-Y.F., Westers, H., Zanen, G., Quax, W.J., Kuipers, O.P., Bron, S., Hecker, M., van Dijk, J.M., 2004. Proteomics of Protein Secretion by *Bacillus subtilis*: Separating the “Secrets” of the Secretome. MMBR 68, 207–233. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.2.207-233.2004>
- Todoriki, K., Mukai, T., Sato, S., Toba, T., 2001. Inhibition of adhesion of food-borne pathogens to Caco-2 cells by *Lactobacillus* strains. J Appl Microbiol 91, 154–159. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01371.x>
- Tomšič, N., Babnik, B., Lombardo, D., Mavčič, B., Kandušer, M., Igljč, A., Kralj-Igljč, V., 2005. Shape and Size of Giant Unilamellar Phospholipid Vesicles Containing Cardiolipin. J. Chem. Inf. Model. 45, 1676–1679. <https://doi.org/10.1021/ci050188b>
- Tong, L., Zhang, X., Hao, H., Liu, Q., Zhou, Z., Liang, X., Liu, T., Gong, P., Zhang, L., Zhai, Z., Hao, Y., Yi, H., 2021. *Lactobacillus rhamnosus* GG Derived Extracellular Vesicles Modulate Gut Microbiota and Attenuate Inflammation in DSS-Induced Colitis Mice. Nutrients 13, 3319. <https://doi.org/10.3390/nu13103319>
- Toté, K., Horemans, T., Vanden Berghe, D., Maes, L., Cos, P., 2010. Inhibitory effect of biocides on the viable masses and matrices of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Appl Environ Microbiol 76, 3135–3142. <https://doi.org/10.1128/AEM.02095-09>
- Touchon, M., Bernheim, A., Rocha, E.P., 2016. Genetic and life-history traits associated with the distribution of prophages in bacteria. ISME J 10, 2744–2754. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.47>
- Toyofuku, M., Cárcamo-Oyarce, G., Yamamoto, T., Eisenstein, F., Hsiao, C.-C., Kurosawa, M., Gademann, K., Pilhofer, M., Nomura, N., Eberl, L., 2017a. Prophage-triggered membrane vesicle formation through peptidoglycan damage in *Bacillus subtilis*. Nat Commun 8, 481. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00492-w>
- Toyofuku, M., Morinaga, K., Hashimoto, Y., Uhl, J., Shimamura, H., Inaba, H., Schmitt-Kopplin, P., Eberl, L., Nomura, N., 2017b. Membrane vesicle-mediated bacterial communication. ISME J 11, 1504–1509. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.13>

- Toyofuku, M., Roschitzki, B., Riedel, K., Eberl, L., 2012. Identification of Proteins Associated with the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Extracellular Matrix. *J. Proteome Res.* 11, 4906–4915. <https://doi.org/10.1021/pr300395j>
- Toyofuku, M., Zhou, S., Sawada, I., Takaya, N., Uchiyama, H., Nomura, N., 2014. Membrane vesicle formation is associated with pyocin production under denitrifying conditions in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: MV production under denitrifying conditions. *Environ Microbiol* 16, 2927–2938. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12260>
- Tsai, C.-C., Hsieh, H.-Y., Chiu, H.-H., Lai, Y.-Y., Liu, J.-H., Yu, B., Tsen, H.-Y., 2005. Antagonistic activity against *Salmonella* infection in vitro and in vivo for two *Lactobacillus* strains from swine and poultry. *Int J Food Microbiol* 102, 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.014>
- Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., Tada, K., 1980. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 26, 171–176. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910260208>
- Tulkens, J., De Wever, O., Hendrix, A., 2020. Analyzing bacterial extracellular vesicles in human body fluids by orthogonal biophysical separation and biochemical characterization. *Nat Protoc* 15, 40–67. <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0236-5>
- Turnbull, L., Toyofuku, M., Hynen, A.L., Kurosawa, M., Pessi, G., Petty, N.K., Osvath, S.R., Cárcamo-Oyarce, G., Gloag, E.S., Shimoni, R., Omasits, U., Ito, S., Yap, X., Monahan, L.G., Cavaliere, R., Ahrens, C.H., Charles, I.G., Nomura, N., Eberl, L., Whitchurch, C.B., 2016a. Explosive cell lysis as a mechanism for the biogenesis of bacterial membrane vesicles and biofilms. *Nat Commun* 7, 11220. <https://doi.org/10.1038/ncomms11220>
- Turnbull, L., Toyofuku, M., Hynen, A.L., Kurosawa, M., Pessi, G., Petty, N.K., Osvath, S.R., Cárcamo-Oyarce, G., Gloag, E.S., Shimoni, R., Omasits, U., Ito, S., Yap, X., Monahan, L.G., Cavaliere, R., Ahrens, C.H., Charles, I.G., Nomura, N., Eberl, L., Whitchurch, C.B., 2016b. Explosive cell lysis as a mechanism for the biogenesis of bacterial membrane vesicles and biofilms. *Nat Commun* 7, 11220. <https://doi.org/10.1038/ncomms11220>
- Turner, L., Bitto, N.J., Steer, D.L., Lo, C., D’Costa, K., Ramm, G., Shambrook, M., Hill, A.F., Ferrero, R.L., Kaparakis-Liaskos, M., 2018. *Helicobacter pylori* Outer Membrane Vesicle Size Determines Their Mechanisms of Host Cell Entry and Protein Content. *Front. Immunol.* 9, 1466. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01466>
- Tzipilevich, E., Habusha, M., Ben-Yehuda, S., 2017. Acquisition of Phage Sensitivity by Bacteria through Exchange of Phage Receptors. *Cell* 168, 186-199.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.003>
- Vahabnezhad, E., Mochon, A.B., Wozniak, L.J., Ziring, D.A., 2013. *Lactobacillus* bacteremia associated with probiotic use in a pediatric patient with ulcerative colitis. *J Clin Gastroenterol* 47, 437–439. <https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e318279abf0>
- Valdéz, J.C., Peral, M.C., Rachid, M., Santana, M., Perdígón, G., 2005. Interference of *Lactobacillus plantarum* with *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in infected burns: the potential use of probiotics in wound treatment. *Clin Microbiol Infect* 11, 472–479. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01142.x>
- van Hoek, M.L., 2013. Biofilms: an advancement in our understanding of *Francisella* species. *Virulence* 4, 833–846. <https://doi.org/10.4161/viru.27023>
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K., Swings, J., 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev* 60, 407–438. <https://doi.org/10.1128/mr.60.2.407-438.1996>
- Vargoorani, M.E., Modarressi, M.H., Vaziri, F., Motevaseli, E., Siadat, S.D., 2020. Stimulatory effects of *Lactobacillus casei* derived extracellular vesicles on toll-like receptor 9 gene expression and cytokine profile in human intestinal epithelial cells. *J Diabetes Metab Disord* 19, 223–231. <https://doi.org/10.1007/s40200-020-00495-3>
- Vasilyeva, N.V., Tsfasman, I.M., Suzina, N.E., Stepnaya, O.A., Kulaev, I.S., 2008. Secretion of bacteriolytic endopeptidase L5 of *Lysobacter* sp. XL1 into the medium by means of outer



- membrane vesicles: Secretion of bacteriolytic enzyme L5. *FEBS Journal* 275, 3827–3835. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06530.x>
- Vaughan, E.E., Heilig, H.G.H.J., Ben-Amor, K., de Vos, W.M., 2005. Diversity, vitality and activities of intestinal lactic acid bacteria and bifidobacteria assessed by molecular approaches. *FEMS Microbiol Rev* 29, 477–490. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2005.04.009>
- Veith, P.D., Chen, Y.-Y., Gorasia, D.G., Chen, D., Glew, M.D., O'Brien-Simpson, N.M., Cecil, J.D., Holden, J.A., Reynolds, E.C., 2014. *Porphyromonas gingivalis* Outer Membrane Vesicles Exclusively Contain Outer Membrane and Periplasmic Proteins and Carry a Cargo Enriched with Virulence Factors. *J. Proteome Res.* 13, 2420–2432. <https://doi.org/10.1021/pr401227e>
- Verreault, D., Gendron, L., Rousseau, G.M., Veillette, M., Massé, D., Lindsley, W.G., Moineau, S., Duchaine, C., 2011. Detection of airborne lactococcal bacteriophages in cheese manufacturing plants. *Appl Environ Microbiol* 77, 491–497. <https://doi.org/10.1128/AEM.01391-10>
- Verreault, D., Moineau, S., Duchaine, C., 2008. Methods for sampling of airborne viruses. *Microbiol Mol Biol Rev* 72, 413–444. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00002-08>
- Vestby, L.K., Grønseth, T., Simm, R., Nesse, L.L., 2020. Bacterial Biofilm and its Role in the Pathogenesis of Disease. *Antibiotics (Basel)* 9, E59. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020059>
- Vijay, A.K., Zhu, H., Willcox, M., Ketelson, H., Stapleton, F., 2020. Bacterial biofilm in silver-impregnated contact lens cases. *Cont Lens Anterior Eye* 43, 408–412. <https://doi.org/10.1016/j.clae.2019.11.004>
- Viruses, I.C. on T. of, King, A.M., 2011. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier.
- Vogel, R., Savage, J., Muzard, J., Camera, G.D., Vella, G., Law, A., Marchioni, M., Mehn, D., Geiss, O., Peacock, B., Aubert, D., Calzolari, L., Caputo, F., Prina-Mello, A., 2021. Measuring particle concentration of multimodal synthetic reference materials and extracellular vesicles with orthogonal techniques: Who is up to the challenge? *J Extracell Vesicles* 10, e12052. <https://doi.org/10.1002/jev2.12052>
- Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P., Foster, S., 2008. Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol Rev* 32, 259–286. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00099.x>
- von Schilde, M.-A., Hörmannspurger, G., Weiher, M., Alpert, C.-A., Hahne, H., Bäuerl, C., van Huynegem, K., Steidler, L., Hrnčir, T., Pérez-Martínez, G., Kuster, B., Haller, D., 2012. Lactocepine secreted by *Lactobacillus* exerts anti-inflammatory effects by selectively degrading proinflammatory chemokines. *Cell Host Microbe* 11, 387–396. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.02.006>
- Vouloumanou, E.K., Makris, G.C., Karageorgopoulos, D.E., Falagas, M.E., 2009. Probiotics for the prevention of respiratory tract infections: a systematic review. *Int J Antimicrob Agents* 34, 197.e1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.11.005>
- Waak, E., Tham, W., Danielsson-Tham, M.-L., 2002. Prevalence and fingerprinting of *Listeria monocytogenes* strains isolated from raw whole milk in farm bulk tanks and in dairy plant receiving tanks. *Appl Environ Microbiol* 68, 3366–3370. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.7.3366-3370.2002>
- Wagner, C., Hensel, M., 2011. Adhesive mechanisms of *Salmonella enterica*. *Adv Exp Med Biol* 715, 17–34. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-0940-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-94-007-0940-9_2)
- Walker, S.A., Davidovich, I., Yang, Y., Lai, A., Goncalves, J.P., Deliwala, V., Busatto, S., Shapiro, S., Koifman, N., Salomon, C., Talmon, Y., Wolfram, J., 2022. Sucrose-based cryoprotective storage of extracellular vesicles. *Extracellular Vesicle* 1, 100016. <https://doi.org/10.1016/j.vesic.2022.100016>
- Walters, M.C., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M.J., Stewart, P.S., 2003. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 317–323. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.1.317-323.2003>

- Wang, H., Huang, Y., Wu, S., Li, Y., Ye, Y., Zheng, Y., Huang, R., 2014. Extracellular DNA inhibits *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and *S. enterica* Serovar Typhi biofilm development on abiotic surfaces. *Curr Microbiol* 68, 262–268. <https://doi.org/10.1007/s00284-013-0468-5>
- Wang, R., Khan, B.A., Cheung, G.Y.C., Bach, T.-H.L., Jameson-Lee, M., Kong, K.-F., Queck, S.Y., Otto, M., 2011. *Staphylococcus epidermidis* surfactant peptides promote biofilm maturation and dissemination of biofilm-associated infection in mice. *J Clin Invest* 121, 238–248. <https://doi.org/10.1172/JCI42520>
- Wang, X., Thompson, C.D., Weidenmaier, C., Lee, J.C., 2018. Release of *Staphylococcus aureus* extracellular vesicles and their application as a vaccine platform. *Nat Commun* 9, 1379. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03847-z>
- Wang, Y., Hoffmann, J.P., Baker, S.M., Bentrup, K.H. zu, Wimley, W.C., Fuselier, J.A., Bitoun, J.P., Morici, L.A., 2021. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilms with bacterial-derived outer membrane vesicles. *BMC Microbiol* 21, 234. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02296-x>
- Watanabe, K., Takesue, S., Jin-Nai, K., Yoshikawa, T., 1970. Bacteriophage Active Against the Lactic Acid Beverage-Producing Bacterium *Lactobacillus casei*. *Appl Microbiol* 20, 409–415.
- Watanabe, T., Nishio, H., Tanigawa, T., Yamagami, H., Okazaki, H., Watanabe, K., Tominaga, K., Fujiwara, Y., Oshitani, N., Asahara, T., Nomoto, K., Higuchi, K., Takeuchi, K., Arakawa, T., 2009. Probiotic *Lactobacillus casei* strain Shirota prevents indomethacin-induced small intestinal injury: involvement of lactic acid. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 297, G506–513. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.90553.2008>
- Watterlot, L., Rochat, T., Sokol, H., Cherbuy, C., Bouloufa, I., Lefèvre, F., Gratadoux, J.-J., Honvo-Hueto, E., Chilmonczyk, S., Blugeon, S., Corthier, G., Langella, P., Bermúdez-Humarán, L.G., 2010. Intra-gastric administration of a superoxide dismutase-producing recombinant *Lactobacillus casei* BL23 strain attenuates DSS colitis in mice. *Int J Food Microbiol* 144, 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.037>
- Wei, X., Vassallo, C.N., Pathak, D.T., Wall, D., 2014. Myxobacteria produce outer membrane-enclosed tubes in unstructured environments. *J Bacteriol* 196, 1807–1814. <https://doi.org/10.1128/JB.00850-13>
- Wessel, A.K., Liew, J., Kwon, T., Marcotte, E.M., Whiteley, M., 2013. Role of *Pseudomonas aeruginosa* Peptidoglycan-Associated Outer Membrane Proteins in Vesicle Formation. *J. Bacteriol.* 195, 213–219. <https://doi.org/10.1128/JB.01253-12>
- West, C.L., Stanisz, A.M., Mao, Y.-K., Champagne-Jorgensen, K., Bienenstock, J., Kunze, W.A., 2020. Microvesicles from *Lactobacillus reuteri* (DSM-17938) completely reproduce modulation of gut motility by bacteria in mice. *PLoS One* 15, e0225481. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225481>
- Whitchurch, C.B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P.C., Mattick, J.S., 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 295, 1487. <https://doi.org/10.1126/science.295.5559.1487>
- Whitman, W.B., Coleman, D.C., Wiebe, W.J., 1998. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6578–6583. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.12.6578>
- Wilmore, J.R., Gaudette, B.T., Gomez Atria, D., Hashemi, T., Jones, D.D., Gardner, C.A., Cole, S.D., Mistic, A.M., Beiting, D.P., Allman, D., 2018. Commensal Microbes Induce Serum IgA Responses that Protect against Polymicrobial Sepsis. *Cell Host Microbe* 23, 302–311.e3. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.01.005>
- Wilton, M., Charron-Mazenod, L., Moore, R., Lewenza, S., 2016. Extracellular DNA Acidifies Biofilms and Induces Aminoglycoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 60, 544–553. <https://doi.org/10.1128/AAC.01650-15>
- Work, E., Knox, K.W., Vesik, M., 1966. The chemistry and electron microscopy of an extracellular lipopolysaccharide from *Escherichia coli*. *Ann NY Acad Sci* 133, 438–449. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1966.tb52382.x>

- Wu, R., Tao, Y., Cao, Y., Zhou, Y., Lin, H., 2020. *Streptococcus mutans* Membrane Vesicles Harboring Glucosyltransferases Augment *Candida albicans* Biofilm Development. *Front Microbiol* 11, 581184. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.581184>
- Wubbolts, R., Leckie, R.S., Veenhuizen, P.T.M., Schwarzmann, G., Möbius, W., Hoernschemeyer, J., Slot, J.-W., Geuze, H.J., Stoorvogel, W., 2003. Proteomic and Biochemical Analyses of Human B Cell-derived Exosomes: POTENTIAL IMPLICATIONS FOR THEIR FUNCTION AND MULTIVESICULAR BODY FORMATION. *J. Biol. Chem.* 278, 10963–10972. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207550200>
- Wuyts, S., Wittouck, S., De Boeck, I., Allonsius, C.N., Pasolli, E., Segata, N., Lebeer, S., 2017. Large-Scale Phylogenomics of the *Lactobacillus casei* Group Highlights Taxonomic Inconsistencies and Reveals Novel Clade-Associated Features. *mSystems* 2, e00061-17. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00061-17>
- Yamasaki-Yashiki, S., Miyoshi, Y., Nakayama, T., Kunisawa, J., Katakura, Y., 2019. IgA-enhancing effects of membrane vesicles derived from *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* NBRC15893. *Bioscience of Microbiota, Food and Health* 38, 23–29. <https://doi.org/10.12938/bmfh.18-015>
- Yan, F., Cao, H., Cover, T.L., Washington, M.K., Shi, Y., Liu, L., Chaturvedi, R., Peek, R.M., Wilson, K.T., Polk, D.B., 2011. Colon-specific delivery of a probiotic-derived soluble protein ameliorates intestinal inflammation in mice through an EGFR-dependent mechanism. *J Clin Invest* 121, 2242–2253. <https://doi.org/10.1172/JCI44031>
- Yang, X., Zhang, W., Qin, X., Cui, M., Guo, Y., Wang, T., Wang, K., Shi, Z., Zhang, C., Li, W., Wang, Z., 2022. Recent Progress on Bioinspired Antibacterial Surfaces for Biomedical Application. *Biomimetics* 7, 88. <https://doi.org/10.3390/biomimetics7030088>
- Yang, Z., Gao, Z., Yang, Zhennai, Zhang, Y., Chen, H., Yang, X., Fang, X., Zhu, Y., Zhang, J., Ouyang, F., Li, J., Cai, G., Li, Y., Lin, X., Ni, R., Xia, C., Wang, R., Shi, X., Chu, L., 2022. *Lactobacillus plantarum*-derived extracellular vesicles protect against ischemic brain injury via the microRNA-101a-3p/c-Fos/TGF- $\beta$  axis. *Pharmacol Res* 182, 106332. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106332>
- Yaron, S., Kolling, G.L., Simon, L., Matthews, K.R., 2000. Vesicle-Mediated Transfer of Virulence Genes from *Escherichia coli* O157:H7 to Other Enteric Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4414–4420. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4414-4420.2000>
- Yeh, Y.-C., Comolli, L.R., Downing, K.H., Shapiro, L., McAdams, H.H., 2010. The Caulobacter Tol-Pal Complex Is Essential for Outer Membrane Integrity and the Positioning of a Polar Localization Factor. *JB* 192, 4847–4858. <https://doi.org/10.1128/JB.00607-10>
- Yilmaz, B., Li, H., 2018. Gut Microbiota and Iron: The Crucial Actors in Health and Disease. *Pharmaceuticals (Basel)* 11, E98. <https://doi.org/10.3390/ph11040098>
- Yonezawa, H., Osaki, T., Kurata, S., Fukuda, M., Kawakami, H., Ochiai, K., Hanawa, T., Kamiya, S., 2009. Outer Membrane Vesicles of *Helicobacter pylori* TK1402 are Involved in Biofilm Formation. *BMC Microbiol* 9, 197. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-197>
- Yoon, S.S., Barrangou-Pouey, R., Breidt, F., Klaenhammer, T.R., Fleming, H.P., 2002. Isolation and characterization of bacteriophages from fermenting sauerkraut. *Appl Environ Microbiol* 68, 973–976. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.2.973-976.2002>
- Yu, S., Zhao, Z., Hao, P., Qiu, Y., Zhao, M., Zhou, G., Zhang, C., Kang, J., Li, P., 2022. Biological Functions and Cross-Kingdom Host Gene Regulation of Small RNAs in *Lactobacillus plantarum*-Derived Extracellular Vesicles. *Front Microbiol* 13, 944361. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.944361>
- Yu, Y.-J., Wang, X.-H., Fan, G.-C., 2018. Versatile effects of bacterium-released membrane vesicles on mammalian cells and infectious/inflammatory diseases. *Acta Pharmacol Sin* 39, 514–533. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.82>
- Yun, S.H., Lee, S.-Y., Choi, C.-W., Lee, H., Ro, H.-J., Jun, S., Kwon, Y.M., Kwon, K.K., Kim, S.-J., Kim, G.-H., Kim, S.I., 2017. Proteomic characterization of the outer membrane vesicle of the halophilic marine bacterium *Novosphingobium pentaromativorans* US6-1. *J Microbiol.* 55, 56–62. <https://doi.org/10.1007/s12275-017-6581-6>

- Zaborowska, M., Taulé Flores, C., Vazirisani, F., Shah, F.A., Thomsen, P., Trobos, M., 2020. Extracellular Vesicles Influence the Growth and Adhesion of *Staphylococcus epidermidis* Under Antimicrobial Selective Pressure. *Front. Microbiol.* 11, 1132. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01132>
- Zeng, L., Skinner, S.O., Zong, C., Sippy, J., Feiss, M., Golding, I., 2010. Decision making at a subcellular level determines the outcome of bacteriophage infection. *Cell* 141, 682–691. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.034>
- Zhang, G.-Q., Hu, H.-J., Liu, C.-Y., Shakya, S., Li, Z.-Y., 2016. Probiotics for Preventing Late-Onset Sepsis in Preterm Neonates: A PRISMA-Compliant Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Medicine (Baltimore)* 95, e2581. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002581>
- Zheng, J., Ruan, L., Sun, M., Gänzle, M., 2015. A Genomic View of Lactobacilli and Pediococci Demonstrates that Phylogeny Matches Ecology and Physiology. *Appl Environ Microbiol* 81, 7233–7243. <https://doi.org/10.1128/AEM.02116-15>
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C.M.A.P., Harris, H.M.B., Mattarelli, P., O’Toole, P.W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G.E., Gänzle, M.G., Lebeer, S., 2020. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* 70, 2782–2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>
- Zhou, L., Srisatjaluk, R., Justus, D.E., Doyle, R.J., 1998. On the origin of membrane vesicles in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 163, 223–228. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13049.x>
- Zingl, F.G., Kohl, P., Cakar, F., Leitner, D.R., Mitterer, F., Bonnington, K.E., Rechberger, G.N., Kuehn, M.J., Guan, Z., Reidl, J., Schild, S., 2020. Outer Membrane Vesiculation Facilitates Surface Exchange and In Vivo Adaptation of *Vibrio cholerae*. *Cell Host Microbe* 27, 225–237.e8. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.12.002>
- Zogaj, X., Bokranz, W., Nimtz, M., Römling, U., 2003. Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family *Enterobacteriaceae* isolated from the human gastrointestinal tract. *Infect Immun* 71, 4151–4158. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.7.4151-4158.2003>
- Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W., Römling, U., 2001. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol Microbiol* 39, 1452–1463. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02337.x>



# ANNEXES

## 1. Matériel Supplémentaire (Article 1)

Table S1. MS-based proteomic analysis of three independent preparations of purified membrane vesicles from *Lactocaseibacillus casei* BL23.

accession	protein name	gene name	mol. weight (Da)	total peptides	coverage (%)	identified in n replicates	R1		R2		R3	
							peptides	spectral counts	peptides	spectral counts	peptides	spectral counts
LcABL_00230	Surface antigen		42406	50	66.42	3	45	777	45	1312	45	1113
LcABL_21960	peptidoglycan lytic protein P45	spi	41481	53	97.28	3	48	736	49	1257	47	880
LcABL_02350	mucosucrase (Fragment)	isa	100594	112	88.49	3	96	779	109	987	78	477
LcABL_02770	hypothetical protein		49693	22	75.91	3	20	638	21	732	21	739
LcABL_21780	hypothetical protein		38694	22	86.64	3	21	320	21	549	18	179
LcABL_21130	peptide ABC transporter substrate-binding protein precursor (oligopeptide/dipeptide-ABC transporter oligopeptide/dipeptide-bln_oppA)	bln_oppA	61395	59	79.68	3	48	236	50	271	48	195
LcABL_02460	transcriptional regulator	lyrR	40173	35	74.18	3	31	237	27	30	27	201
LcABL_18220	peptide ABC transporter substrate-binding protein	oppA	66461	63	74.87	3	46	202	59	255	40	198
LcABL_01640	hypothetical protein	yhGE	96914	38	52.86	3	33	227	35	31	31	187
LcABL_17510	N-acetyluracetyl-L-alanine amidase, family 3	ami	86164	36	86.14	3	30	142	33	198	32	202
LcABL_30040	hypothetical protein		41342	41	80.51	3	34	154	35	169	27	151
LcABL_11330	Endoase	eno	47111	39	65.44	3	30	114	37	191	35	159
LcABL_24520	PII-type proteinase precursor (lactocarpin) (cell wall-associated serine proteinase) (LP151)	prpP	19982	79	59.88	3	60	140	64	129	72	165
LcABL_26750	Elongation factor G	fusA	76861	58	81	3	40	107	58	209	24	53
LcABL_27170	hypothetical protein		50410	28	72.15	3	23	116	26	133	25	119
LcABL_15850	pyruvate kinase	pyk	62883	52	74.15	3	28	92	51	166	30	88
LcABL_24090	hypothetical protein		35368	23	48.26	3	19	97	17	113	22	134
LcABL_02100	serine-type D-Ala-D-Ala carboxypeptidase	dacA	46903	44	66.51	3	39	113	42	128	34	98
LcABL_17030	bifunctional glycoyltransferase/transpeptidase penicillin-binding protein 1A	pbp1A	82791	47	59.58	3	37	102	37	107	32	81
LcABL_15580	Elongation factor Tu	tuf	43573	36	71.97	3	28	71	35	138	25	77
LcABL_06650	hypothetical protein		31747	20	80.53	3	17	71	19	116	16	82
LcABL_11310	Phosphoglycerate kinase	pgk	42220	31	77.02	3	15	42	26	112	29	100
LcABL_28750	XaIA precursor	xaiA	11644	45	61.13	3	40	98	41	90	27	58
LcABL_11740	Spermidine/putrescine ABC transporter substrate-binding protein	potD	40696	29	71.71	3	29	88	28	96	21	48
LcABL_12590	Zn-dependent protease		30642	18	81.94	3	16	75	17	81	18	74
LcABL_05010	fructose-bisphosphate aldolase	fba	31502	25	87.03	3	17	48	24	122	20	56
LcABL_27020	hypothetical protein		31171	19	80.27	3	12	56	14	81	17	86
LcABL_21880	hypothetical protein		30016	13	75.35	3	13	99	12	68	12	49
LcABL_10630	phosphoglucumate	pgm	63500	47	78.43	3	29	58	44	120	22	34
LcABL_22140	Wtr	wtr	32647	22	67.11	3	21	69	20	79	20	61
LcABL_12870	Glucose-6-phosphate isomerase	pgi	49323	39	62.11	3	24	47	38	112	12	28
LcABL_01680	phosphoketolase	xpk	89632	44	69.36	3	21	42	44	121	14	22
LcABL_21740	xylanase/chitin deacetylase		36662	20	65.06	3	19	58	18	73	17	51
LcABL_17990	30S ribosomal protein S2	rrpB	29547	30	75.95	3	21	51	30	108	11	21
LcABL_11320	Triosephosphate isomerase	tpiA	26980	23	94.42	3	17	50	20	86	13	37
LcABL_11880	glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase	gmsS	65812	34	65.84	3	16	30	29	101	24	41
LcABL_23150	phosphoglyceromutase	gpmA	25953	22	72.93	3	12	47	22	93	10	31
LcABL_18990	6-phosphogluconate dehydrogenase	gndA	52006	38	73.09	3	17	37	37	103	12	28
LcABL_22950	3-oxoacyl-acyl-carrier protein synthase II	fabF	42005	22	77.34	3	16	37	21	93	15	37
LcABL_27630	tagatose 1,6-diphosphate aldolase	lacD2	36366	22	78.31	3	15	36	22	77	18	46
LcABL_22360	acylttransferase 3		26297	11	49.37	3	10	53	10	56	11	48
LcABL_25140	cysteine aminopeptidase C2 (Bleomycin hydrolase)	pepC2	50601	39	69.64	3	18	36	38	83	17	38
LcABL_05340	membrane alanine aminopeptidase	pepN	94496	35	64.45	3	24	32	33	89	17	29
LcABL_11540	sugar ABC transporter periplasmic protein		48073	27	56.06	3	17	34	25	57	22	54
LcABL_15600	Trigler factor	tig	49379	30	73.26	3	16	26	29	88	19	29
LcABL_14260	peptide ABC transporter substrate-binding lipoprotein	oppA	60099	27	54.21	3	18	34	22	56	17	48
LcABL_07310	UDP-glucose 4-epimerase (galactowaldenase) (UDP-galactose 4-epimerase)	galE	36338	29	91.84	3	18	36	29	87	10	15
LcABL_20230	serine-type D-Ala-D-Ala carboxypeptidase	pdpX2	42020	16	43.38	3	15	46	15	55	14	31
LcABL_30150	ArpJ protein	arpJ	52277	17	22.2	3	12	34	17	44	16	49
LcABL_24230	transcriptional regulator	lyrR	39050	23	65.91	3	19	47	19	47	13	33
LcABL_07680	ABC transporter periplasmic protein		34121	18	59.94	3	13	28	17	46	14	46
LcABL_04840	phage infection protein	pip	98735	27	44.62	3	18	27	24	45	21	42
LcABL_19780	hypothetical protein		63409	34	65.91	3	14	22	31	74	15	17
LcABL_09490	Leucine-tRNA ligase	leuS	91527	41	67.62	3	14	19	41	89	3	3
LcABL_08730	bifunctional glycoyltransferase/transpeptidase penicillin-binding protein 1B	pbp1B	37849	17	37.43	3	13	32	17	45	9	32
LcABL_15650	glutamine ABC transporter substrate-binding and permease	glnPH2	52744	20	28.66	3	14	35	17	43	13	29
LcABL_02700	alpha/beta hydrolase superfamily protein		33154	18	67.67	3	14	37	17	45	11	21
LcABL_27160	L-lactate dehydrogenase (L-LDH)	ldh	35499	18	57.06	3	8	16	16	36	16	49
LcABL_24610	50S ribosomal protein L1	rrpIA	24480	15	49.78	3	12	26	15	58	8	17
LcABL_22210	RimB	rimB	38644	22	73.61	3	13	25	21	67	7	9
LcABL_14750	30S ribosomal protein S4	rrpS0	23306	19	70.44	3	12	24	19	59	7	17
LcABL_21800	RimB	rimB	38631	21	75.37	3	12	24	20	66	7	9
LcABL_15990	30S ribosomal protein S1	rrpA	47649	20	61.28	3	8	12	20	43	16	42
LcABL_22980	enoyl-acyl-carrier-protein reductase	fabK	34312	21	69.82	3	11	21	20	64	6	12

LCABL_20460	hypothetical protein	27330	13	60	3	10	33	11	28	11	35
LCABL_26580	50S ribosomal protein L5	20168	13	57.78	3	9	21	13	55	9	20
LCABL_04690	NADH peroxidase	49830	18	57.68	3	14	25	17	53	14	16
LCABL_24200	60 kDa chaperonin	57428	21	47.06	3	15	24	21	40	14	28
LCABL_16370	inorganic pyrophosphatase	33789	21	79.68	3	12	18	21	49	13	25
LCABL_03560	hypothetical protein	25796	8	70.08	3	7	32	7	68	4	24
LCABL_21540	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	57850	26	62.86	3	11	18	26	68	3	6
LCABL_14810	valyl-tRNA synthetase	100668	34	47.61	3	11	15	34	73	3	4
LCABL_24460	peptide ABC transporter substrate-binding (lipoprotein)	59524	22	43.15	3	13	25	16	31	16	34
LCABL_24550	50S ribosomal protein L10	18177	61.9	18177	3	13	21	17	49	10	20
LCABL_02480	cell wall-associated hydrolase	23055	14	79.39	3	7	18	7	15	14	55
LCABL_26690	50S ribosomal protein L4	22442	13	56.52	3	6	20	13	55	4	13
LCABL_11620	phosphate acetyltransferase (phosphotransacylase)	34930	14	58.46	3	8	23	14	46	8	16
LCABL_22200	rplD	32189	17	74.73	3	9	21	17	54	5	10
LCABL_10770	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	21525	13	51.53	3	12	35	13	12	35	35
LCABL_26650	50S ribosomal protein L22	12730	13	71.79	3	7	20	13	38	5	24
LCABL_24920	Glutamate-tRNA ligase	56853	28	57.34	3	11	15	27	55	7	12
LCABL_01520	cell surface protein	27509	13	73.54	3	13	26	11	29	11	26
LCABL_01370	D-lactate dehydrogenase	36907	17	66.07	3	10	18	17	48	8	15
LCABL_30540	glutamine-binding protein / glutamine transporter permease	52877	12	30.04	3	10	24	11	33	9	23
LCABL_19480	arginyl-tRNA synthetase (arginine-tRNA ligase) (ArgRS)	63304	27	53.57	3	14	18	26	61	1	1
LCABL_26560	50S ribosomal protein L6	19902	12	56.82	3	8	21	12	48	4	9
LCABL_25960	3-oxoacyl-tRNA-carrier protein reductase	25277	16	78.51	3	7	18	16	51	5	8
LCABL_15840	6-phosphofructokinase	34230	17	61.76	3	11	15	17	57	4	5
LCABL_26800	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	136433	42	46.56	3	9	10	40	65	1	1
LCABL_17780	Chaperone protein DnaK	67564	30	58.33	3	14	17	24	25	25	36
LCABL_02860	beta-N-acetylglucosaminidase precursor	61792	21	41.65	3	13	25	14	22	16	26
LCABL_26570	30S ribosomal protein S8	14774	8	55.3	3	7	18	8	37	6	18
LCABL_11840	oligoneuraminidase F2	67477	28	59.9	3	6	9	28	62	2	2
LCABL_11300	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	36707	15	68.24	3	6	9	9	15	15	47
LCABL_26540	30S ribosomal protein S5	17535	13	72.46	3	7	19	13	37	6	15
LCABL_27640	hypothetical protein	6957	18	69.97	3	11	16	18	44	6	11
LCABL_16300	galactose mutarotase related enzyme	32630	16	69.86	3	8	16	16	51	3	4
LCABL_21220	hypothetical protein	127568	28	47.25	3	10	10	14	17	24	43
LCABL_22970	Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase	32018	13	53.09	3	7	15	13	44	3	11
LCABL_26500	Adenylate kinase	23635	18	61.93	3	10	15	18	47	5	8
LCABL_18780	Bifunctional dimethylsilyltransferase penicillin-binding protein 2B	77190	20	47.74	3	11	17	16	31	10	21
LCABL_01070	phospholipase A2 family enzyme	19104	12	68.24	3	9	22	12	27	9	20
LCABL_27800	hypothetical protein	31414	11	69.8	3	5	13	7	18	11	37
LCABL_17980	Elongation factor Ts	31701	20	62.8	3	7	11	17	40	10	17
LCABL_13880	ATP synthase subunit beta	52926	23	70.9	3	9	13	22	48	5	7
LCABL_17070	asparaginyl-tRNA synthetase	50861	22	71.53	3	12	16	22	50	2	2
LCABL_14990	bifunctional dimerisation/transpeptidase penicillin-binding 2B	76853	20	33.71	3	14	20	10	20	18	27
LCABL_26680	50S ribosomal protein L23	11560	14	76	3	8	16	13	40	5	11
LCABL_13300	hypothetical protein	38282	10	50.87	3	8	16	10	28	9	22
LCABL_17920	prolyl-tRNA synthetase	64859	32	69.08	3	6	10	26	43	12	12
LCABL_30300	oxidoreductase	34035	16	73.46	3	8	14	16	40	4	10
LCABL_16830	Formate-tetrahydrofolate ligase	58901	23	48.83	3	10	16	22	43	5	5
LCABL_18750	glucokinase	63788	13	63.78	3	6	12	13	37	6	14
LCABL_05450	cysteine synthase	32718	20	82.52	3	9	15	20	36	7	12
LCABL_16930	ribonucleotide-diphosphate reductase subunit beta	37827	15	70.25	3	9	12	15	44	4	7
LCABL_27690	methylol-tRNA synthetase	74929	26	46.97	3	13	16	12	15	24	29
LCABL_31160	hypothetical protein	134400	16	30.85	3	9	16	10	16	15	28
LCABL_30530	glutamine-binding protein / glutamine transporter permease	52772	7	18.65	3	7	13	9	24	8	23
LCABL_24680	hypothetical protein	14002	8	41.41	3	7	15	8	23	8	22
LCABL_24620	50S ribosomal protein L11	14820	12	65.96	3	5	12	12	40	4	8
LCABL_01530	hypothetical protein	26019	11	55.47	3	8	17	9	17	7	25
LCABL_30430	extracellular solute-binding protein, family 1	46541	16	51.06	3	11	16	12	24	9	19
LCABL_05330	cell envelope-associated proteinase PthR	192861	24	23.11	3	13	20	19	26	8	13
LCABL_25130	cysteine aminopeptidase	49475	26	71.3	3	5	6	26	48	4	4
LCABL_15110	isoleucine-tRNA ligase	105008	29	44.07	3	11	13	27	41	4	4
LCABL_06140	Mra1	32337	9	48.46	3	8	20	9	23	5	14
LCABL_20590	Serine-tRNA ligase	48607	18	63	3	10	11	18	41	3	2
LCABL_13640	Dipeptidase D-type (U34 family)	54315	25	51.89	3	8	10	25	44	5	5
LCABL_15430	GTP-binding protein-BipA-EF-TU family	67911	30	40.72	3	15	20	9	16	16	20
LCABL_12230	Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A	51337	16	49.59	3	10	16	16	32	5	7
LCABL_26700	50S ribosomal protein L3	22627	17	60.48	3	5	15	17	38	1	2
LCABL_26760	30S ribosomal protein S7	17924	17	64.1	3	9	12	17	38	3	4

LCABL ID	Protein Name	Gene	Length	Start	End	Score	Start	End	Score	Start	End	Score	Start	End	Score	Start	End	Score	Start	End	Score
LCABL_12210	hypothetical protein	camS	41596	11	37,6	3	7	14	6	14	11	25									
LCABL_26330	50S ribosomal protein L13	rpmM	16549	10	73,65	3	5	11	10	32	5	9									
LCABL_02140	oxido-reductase	vggG	31618	15	73,78	3	9	11	15	33	4	7									
LCABL_12240	Aspartyl-(glutamyl- <i>t</i> -RNA(Asn/Gln) amidotransferase subunit B	gatB	53353	20	60,71	3	6	8	20	41	2	2									
LCABL_24540	50S ribosomal protein L7/L12	rpL	12518	10	83,61	3	6	9	9	15	10	26									
LCABL_06730	hypothetical protein		24198	8	58,8	3	7	14	6	14	7	22									
LCABL_06680	hypothetical protein		22498	11	67,12	3	8	13	6	17	9	20									
LCABL_10970	hypothetical protein		18773	10	76,92	3	4	9	10	28	6	13									
LCABL_13860	ATP synthase subunit alpha	atpA	55300	16	40,08	3	9	11	16	35	4	4									
LCABL_08780	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase (Fragment)	pepR	49774	14	37,44	3	9	16	13	21	8	12									
LCABL_21620	Prolinase	pepV	34167	14	54,49	3	9	11	14	36	2	2									
LCABL_08770	dipeptidase PepV	pepV	50313	14	44,97	3	4	11	14	34	4	5									
LCABL_21580	Dipeptidase	pepD3	52188	14	50,96	3	4	4	14	40	3	4									
LCABL_26640	30S ribosomal protein S3	rspC	24872	9	37,73	3	3	5	9	39	3	4									
LCABL_15700	1-phosphofruktokinase	fruk	32121	20	78,62	3	5	10	20	34	4	4									
LCABL_01350	D-alanine-D-alanine ligase	ddl	39020	18	71,99	3	3	3	17	26	14	18									
LCABL_28500	hypothetical protein	lhpP	52993	8	32,11	3	6	18	7	19	5	10									
LCABL_21770	hypothetical protein		19602	7	40,94	3	6	13	6	18	5	15									
LCABL_26440	50S ribosomal protein L17	rpLQ	14229	5	38,58	3	4	13	5	24	4	9									
LCABL_08580	DHD	dHD	47810	8	18,68	3	5	11	7	14	7	20									
LCABL_30340	EIAB	manL	35318	13	44,14	3	6	9	12	25	5	11									
LCABL_26670	50S ribosomal protein L2	rpmL	30305	12	42,09	3	5	10	12	25	5	11									
LCABL_30400	amino acid:ABC transporter substrate-binding protein/permease	glnP	58177	12	30,83	3	9	13	8	17	8	14									
LCABL_28810	hypothetical protein		22606	9	53,37	3	7	15	7	15	7	14									
LCABL_26710	30S ribosomal protein S10	rspJ	11736	8	65,69	3	4	7	8	27	6	10									
LCABL_08400	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	zwf	56008	20	56,16	3	8	8	19	32	3	4									
LCABL_08460	alanyl-RNA synthetase	ahs	97226	29	46,31	3	4	5	29	38	1	1									
LCABL_06890	alpha alpha-phosphotrihalase	treA	61934	19	42,7	3	9	10	18	28	5	5									
LCABL_02060	inosine-5-monophosphate dehydrogenase	guaB	52641	20	59,8	3	3	4	20	37	2	2									
LCABL_06760	hypothetical protein		72660	13	27,72	3	9	16	7	11	10	15									
LCABL_27070	ATP-dependent zinc metalloendopeptidase FtsH (cell division protein FtsH)	ftsH	77742	14	29,65	3	8	10	13	18	9	14									
LCABL_13520	hypothetical protein	laaO	31130	11	48,41	3	8	12	9	16	7	14									
LCABL_22930	(3R)-hydroxymisristoyl-ACP dehydratase	fabZ	15988	5	25,34	3	3	5	5	25	2	8									
LCABL_27210	CBS domain containing protein		24889	11	65,16	3	7	10	11	28	4	4									
LCABL_19810	ATP-dependent ctp protease ATP-binding protein	ctpE	77221	23	38,54	3	2	2	21	36	3	3									
LCABL_27380	CTP synthetase	pyrG	59781	18	51,5	3	3	3	18	37	1	1									
LCABL_29670	nicotinate phosphoribosyltransferase	prcB	52098	14	45,4	3	7	9	14	25	6	6									
LCABL_27730	L-2-hydroxycaproate dehydrogenase	hcdD3	32571	14	76,74	3	8	10	14	27	3	3									
LCABL_10960	hypothetical protein		27703	11	54,47	3	5	5	10	33	2	2									
LCABL_17260	Glycine--RNA ligase beta subunit	glyS	76051	22	41,65	3	5	11	7	9	18	19									
LCABL_20240	NH(3)-dependent NAD(+) synthetase	nadE	30073	15	76	3	5	7	15	30	2	2									
LCABL_22920	Biotin carboxylase	acc	49023	18	57,93	3	7	8	18	29	2	2									
LCABL_19210	Threonine--RNA ligase	thnS	74588	19	35,31	3	11	13	2	3	19	22									
LCABL_24270	redox-sensing transcriptional repressor Flex	rex	24171	11	53	3	5	7	11	27	4	4									
LCABL_00860	hypothetical protein		27166	5	35	3	3	11	5	18	3	8									
LCABL_01690	peptide ABC transporter substrate-binding lipoprotein	oppA	59672	9	19,59	3	3	7	10	5	11	8									
LCABL_17890	transcription elongation factor NusA	nusA	45832	18	56,35	3	3	4	18	30	2	2									
LCABL_18310	dihydroxyacetone kinase related enzyme		59631	18	46,77	3	5	5	18	29	2	2									
LCABL_17710	adenine phosphoribosyltransferase	apt	18897	11	76	3	5	6	11	28	1	2									
LCABL_25920	substrate-binding protein	mstC	35097	16	62,62	3	8	11	16	23	2	2									
LCABL_26660	30S ribosomal protein S19	rpsS	10577	8	56,99	3	4	6	8	25	3	4									
LCABL_27510	bifunctional protein glnU (includes: LDP-N-acetylglucosamine-1-phosphatase uridylyltransf	glnU	50059	13	49,35	3	8	8	13	24	3	3									
LCABL_16010	histone-like DNA-binding protein HU	hbuS	9526	9	73,63	3	5	7	5	9	9	18									
LCABL_21880	glutamine ABC transporter substrate-binding protein	ghnH1	29714	9	37,23	3	5	8	8	13	8	13									
LCABL_28670	hypothetical protein	ycf	72578	6	11,98	3	6	13	4	12	4	9									
LCABL_29790	exopolysphatase-related protein		33122	13	62,58	3	7	9	10	21	4	4									
LCABL_12510	methionine aminopeptidase	pepM2	29956	13	65,33	3	4	5	12	28	1	1									
LCABL_13990	Outer membrane lipoprotein	plpB	30436	9	37,09	3	4	6	6	14	8	14									
LCABL_07140	iron-dependent peroxidase		35147	14	65,18	3	4	7	14	24	1	2									
LCABL_17420	Aspartate--RNA ligase	apsS	67554	18	40,27	3	6	6	9	12	12	14									
LCABL_3420	protein maturation protease (peptidylprolyl isomerase)	prfM	33498	8	41,67	3	5	6	7	15	7	11									
LCABL_30110	hypothetical protein	ych	27137	7	27,37	3	7	12	6	11	5	9									
LCABL_31120	BacG protein	bacG	38447	13	38,7	3	6	6	12	13	5	9									
LCABL_23200	Sortase	srtA	26180	11	47,64	3	6	8	10	16	6	7									
LCABL_07440	tagatase 1,6-diphosphate aldolase	lacD2	36393	9	36,04	3	5	9	9	15	4	7									
LCABL_15540	30S ribosomal protein S15	rspO	10300	4	43,82	3	8	8	4	17	3	6									
LCABL_08700	CcpA protein (Catabolite regulator protein)	ccpA	36385	12	55,26	3	7	12	8	13	4	6									
LCABL_10560	YnfB	ynfB	53565	15	42,6	3	3	5	15	21	4	5									



LCABL_12560	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	33774	11	52,96	3	3	4	5	11	23	3	3
LCABL_18680	glutamine synthetase	50396	14	47,31	3	6	6	8	14	21	2	2
LCABL_27700	prolyl aminopeptidase	33389	11	63,01	3	1	1	1	11	29	1	1
LCABL_26600	50S ribosomal protein L14	13003	5	34,43	3	2	2	4	5	20	4	6
LCABL_16920	ribonucleotide-diphosphate reductase subunit alpha	81893	15	31,67	3	5	5	5	12	19	6	6
LCABL_11940	modification methylase IaaG	37043	15	61,61	3	3	3	3	15	26	1	1
LCABL_26140	phosphonate ABC transporter substrate-binding protein	34220	8	44,76	3	3	3	4	6	13	7	12
LCABL_30950	Capsid protein	56530	14	36,49	3	4	4	4	14	20	5	5
LCABL_11820	Phosphoglucosamine mutase	48795	11	44,05	3	7	9	9	14	26	2	3
LCABL_08210	HAD-superfamily hydrolase, subfamily IA, variant 1	24639	14	83,78	3	1	1	1	14	26	2	2
LCABL_15370	pyruvate dehydrogenase complex, E1 component, beta subunit	35356	12	44,31	3	3	3	4	12	23	2	2
LCABL_26550	50S ribosomal protein L18	12969	6	52,1	3	7	7	5	15	15	3	6
LCABL_11600	YscE protein (Fragment)	32151	15	53,54	3	2	2	4	15	22	1	2
LCABL_18980	Response regulator	26318	9	44,3	3	2	2	4	9	22	2	2
LCABL_18100	50S ribosomal protein L19	13377	6	43,48	3	3	3	6	6	20	1	2
LCABL_19520	dihydroorotate dehydrogenase IA	34040	7	28,21	3	5	8	8	7	18	1	2
LCABL_21470	peptide ABC transporter substrate-binding protein	59783	9	21,15	3	3	5	5	8	11	6	11
LCABL_05320	cell envelope-associated proteinase PrtR	236397	12	8,29	3	10	10	11	7	10	5	6
LCABL_26630	50S ribosomal protein L16	16037	8	43,06	3	3	3	3	8	23	1	1
LCABL_08550	D-alanine--poly(phosphoribitol) ligase subunit 1	56218	10	33	3	3	3	5	10	21	1	1
LCABL_19300	UDP-N-acetylmuramate--L-alanine ligase	48843	10	31,42	3	4	4	4	9	14	6	8
LCABL_10070	MalY	44728	8	25,69	3	3	3	4	7	15	5	7
LCABL_26460	30S ribosomal protein S11	13772	8	52,71	3	3	3	5	8	17	1	4
LCABL_03280	Low affinity penicillin-binding protein 5 (PBPS)	71104	9	21,87	3	8	8	11	4	6	4	8
LCABL_24770	hypothetical protein	32733	5	22,04	3	2	5	5	4	13	4	7
LCABL_10110	UFPO210 protein LCABL_10110	48222	8	30,59	3	4	6	6	8	13	3	6
LCABL_12650	extracellular protein	54175	9	33,66	3	5	6	6	9	13	5	6
LCABL_15190	methylthioadenosine nucleosidase (nucleoside phosphorylase)	24677	11	64,41	3	3	3	3	11	18	2	4
LCABL_12470	hypothetical protein	23084	9	58,91	3	3	3	6	9	15	2	4
LCABL_13910	rod shape-determining protein MreB	34972	11	50,15	3	3	3	4	11	19	3	3
LCABL_20650	acetolactate synthase	60354	9	32,44	3	4	4	4	9	19	2	2
LCABL_21850	UDP-glucose 4-epimerase	34707	13	44,05	3	2	3	3	12	21	1	1
LCABL_30010	hypothetical protein	29248	8	30,8	3	1	1	1	1	8	22	8
LCABL_03070	peptide ABC transporter substrate-binding protein	60702	9	23,03	3	5	9	9	4	7	5	8
LCABL_09330	YnfI	78017	9	21,09	3	6	7	7	8	10	5	7
LCABL_10450	cell-division associated ABC transporter ATP-binding FtsE subunit	25504	11	63,6	3	4	5	5	10	14	4	5
LCABL_2070	branched-chain amino acid aminotransferase	37827	10	49,56	3	4	4	4	9	16	2	4
LCABL_16780	aspartate carbamoyltransferase catalytic subunit	35808	11	43,75	3	1	1	1	11	20	2	3
LCABL_08430	phosphotransferase, DHH family protein	34403	12	65,09	3	3	4	5	12	20	2	2
LCABL_17970	uridylylate kinase	25861	8	53,56	3	3	3	5	8	17	2	2
LCABL_26470	30S ribosomal protein S13	13491	7	49,59	3	4	5	5	7	17	2	2
LCABL_27310	UDP-N-acetylmuramoyl-tripeptide--D-alanyl-D- alanine ligase	50573	11	43,94	3	3	3	5	11	18	1	1
LCABL_26030	outer membrane protein	64555	8	19,31	3	2	4	4	4	8	15	15
LCABL_20510	hypothetical protein	18567	6	48,85	3	4	5	5	5	8	6	10
LCABL_16610	hypothetical protein	31984	12	49,31	3	2	2	3	12	18	1	2
LCABL_31000	ribose phosphate pyrophosphokinase	33665	9	45,75	3	3	3	4	9	17	2	2
LCABL_19050	hypothetical protein	22550	9	55,28	3	3	3	3	9	19	1	1
LCABL_30080	Periplasmic trypsin-like serine protease Itra/DegQ family	44951	8	37,1	3	3	3	3	5	6	7	14
LCABL_26610	30S ribosomal protein S17	10184	2	19,54	3	2	2	2	2	11	2	5
LCABL_00110	30S ribosomal protein S18	9128	4	43,59	3	1	1	2	4	16	2	4
LCABL_26320	30S ribosomal protein S9	14241	4	45,38	3	2	5	5	4	14	2	3
LCABL_18150	30S ribosomal protein S16	10489	3	32,97	3	2	6	6	3	13	2	3
LCABL_08310	S-ribosylhomocysteine lyase	17267	5	56,69	3	4	4	4	5	16	2	2
LCABL_27770	hypothetical protein	34911	11	40,91	3	3	4	5	11	15	2	2
LCABL_16100	hypothetical protein	30087	8	46,43	3	3	3	6	8	15	1	1
LCABL_17090	hypothetical protein	18389	4	29,01	3	3	3	8	2	4	4	9
LCABL_20490	NAD-dependent epimerase/dehydratase	23341	6	52,83	3	2	3	3	5	14	3	4
LCABL_28660	ribose-5-phosphate isomerase A	6114	9	61,14	3	1	1	1	9	18	2	2
LCABL_20640	alpha-acetolactate decarboxylase	4703	9	39,8	3	3	3	3	9	16	2	2
LCABL_27010	33 kDa chaperonin	31366	7	39,8	3	3	3	3	7	16	2	2
LCABL_15010	UDP-N-acetylmuramoylalanine--D-glutamate ligase	50444	12	37,47	3	4	4	4	11	16	1	1
LCABL_27550	pur operon repressor	31173	12	56,74	3	6	6	6	10	14	1	1
LCABL_10410	ribosomal subunit interface protein	20998	5	40,54	3	4	4	4	5	8	4	8
LCABL_15730	acyltransferase 3	74290	6	11,23	3	4	4	6	5	7	3	7
LCABL_10500	phosphate ABC transporter substrate-binding lipoprotein	30585	4	19,93	3	4	7	7	4	8	2	5
LCABL_01490	hypothetical protein	73957	9	20	3	3	3	3	6	8	3	3
LCABL_28780	hypothetical protein	48583	4	11,11	3	1	1	3	4	10	2	6
LCABL_01860	phosphoglycerate dehydrogenase	33599	9	48,75	3	1	1	1	9	16	2	2

LCABL_17380	Putative phosphotransferase LCABL_17380	30900	9	47.83	3	2	2	9	15	1	2
LCABL_02540	Type I signal peptidase-like protein	22543	7	46.23	3	5	9	6	8	1	2
LCABL_16950	oligopeptidase O	71505	12	22.24	3	2	2	3	4	11	3
LCABL_31070	glucosamine-6-phosphate deaminase (glucosamine-6-phosphate isomerase) [GNPDA] [GIC6P deaminase]	26015	10	51.9	3	3	3	10	12	3	3
LCABL_23000	3-oxoacyl-(acyl-carrier protein) synthase III	34718	9	55.62	3	1	2	9	15	1	1
LCABL_18710	Aluminum resistance protein	44644	6	20.1	3	2	2	4	9	5	6
LCABL_27110	DIVC protein (Fragment)	15075	3	21.05	3	6	3	3	6	3	5
LCABL_26520	50S ribosomal protein L15	15466	6	38.36	3	2	3	5	10	2	4
LCABL_22350	Wzd	34797	4	15.86	3	5	4	4	8	2	4
LCABL_18190	Signal recognition particle-docking protein FtsY	36154	8	35.65	3	1	1	8	13	3	3
LCABL_08860	N-acetylglucosamine catabolic protein	28404	8	42.64	3	1	1	8	15	1	1
LCABL_27360	50S ribosomal protein L31 type B	9548	4	59.04	3	3	4	4	12	1	1
LCABL_22120	Cpl	78536	12	20.67	3	2	2	4	4	9	10
LCABL_21970	Tyrosyl-tRNA synthetase (tyrosine-tRNA ligase) [TYRS]	47764	10	24.06	3	1	1	7	10	5	5
LCABL_18620	50S ribosomal protein L21	11318	8	58.25	3	2	3	5	10	3	3
LCABL_10180	thiamine biosynthesis lipoprotein	38239	8	34.09	3	4	5	6	8	2	3
LCABL_02760	Purine nucleoside phosphorylase deoD-type	25891	7	49.16	3	4	7	10	2	2	2
LCABL_06750	hypothetical protein	24315	4	33.33	3	3	4	3	6	1	5
LCABL_30060	small heat shock protein HSP19.5	16520	5	44.83	3	1	1	5	10	3	4
LCABL_10210	hypothetical protein	37646	7	32.95	3	4	6	4	5	4	4
LCABL_03610	hypothetical protein	14779	4	52.27	3	2	2	4	10	1	3
LCABL_10620	thioredoxin reductase	34487	7	18.61	3	4	6	3	6	3	3
LCABL_14120	universal stress protein, UspA family	17986	5	26.67	3	1	2	5	12	1	1
LCABL_26450	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	34759	8	38.78	3	3	3	7	11	1	1
LCABL_06710	hypothetical protein	71822	7	16.34	3	1	2	2	2	7	10
LCABL_01760	hypothetical protein	23595	4	30.95	3	2	2	3	5	3	7
LCABL_23020	(3R)-hydroxymristoyl-ACP dehydratase	15601	3	37.93	3	2	2	3	9	3	3
LCABL_22990	acyl-carrier protein	9014	4	54.43	3	2	3	4	8	2	3
LCABL_12950	Prophage $\lambda$ p2 protein 7	12309	5	50	3	1	1	2	5	5	7
LCABL_01770	methanol dehydrogenase-like protein	47712	4	13.96	3	2	2	4	6	3	5
LCABL_02740	deoxyribose-phosphate aldolase	23014	7	50.68	3	1	1	7	11	1	1
LCABL_17210	hypothetical protein	29031	8	48.48	3	1	1	8	11	1	1
LCABL_18900	phenylalanyl-tRNA synthetase subunit beta	87704	10	17.56	3	1	1	10	11	1	1
LCABL_19170	translation initiation factor IF-3	17303	7	46.1	3	1	1	7	11	1	1
LCABL_07550	hypothetical protein	28463	6	27.2	3	3	3	6	9	1	1
LCABL_23430	asparagine synthase	73066	8	14.35	3	3	3	3	6	6	6
LCABL_28910	hypothetical protein	26836	6	38.19	3	1	1	6	8	2	3
LCABL_27060	hypothetical protein	50853	6	10.72	3	1	2	6	7	3	3
LCABL_28180	protein recA	23933	6	23.93	3	2	2	6	7	2	3
LCABL_06160	Sortase SrtA	24942	5	37.67	3	5	3	4	3	3	3
LCABL_01130	Adenylosuccinate synthetase	47422	6	19.26	3	1	1	6	9	2	2
LCABL_27890	LenA precursor	22046	3	15.84	3	3	4	3	6	1	2
LCABL_15570	BS_ysaA related protein with TPR repeats	33497	6	32.34	3	1	1	6	10	1	1
LCABL_15090	cell-division initiation protein (septum placement)	28461	4	23.08	3	1	4	4	7	1	1
LCABL_01040	hypothetical protein	13707	3	33.6	3	1	1	2	3	3	7
LCABL_07090	alpha/beta hydrolase superfamily protein	28935	4	18.53	3	2	2	3	4	2	5
LCABL_23710	hypothetical protein	15739	3	32.62	3	2	2	3	4	3	5
LCABL_00830	hypothetical protein	41635	6	23.22	3	1	1	4	6	3	4
LCABL_22080	hypothetical protein	30479	3	20.33	3	2	3	2	4	2	4
LCABL_00730	Tryptophan synthase beta chain	43821	1	1.72	3	1	2	1	7	1	7
LCABL_01990	16S rRNA methyltransferase GidB	26639	7	33.2	3	1	1	7	9	1	1
LCABL_11390	exonuclease B, RNase II family	88952	8	15.46	3	1	1	8	9	1	1
LCABL_19150	50S ribosomal protein L20	13422	5	22.03	3	1	1	5	9	1	1
LCABL_16860	oxidoreductase	22767	4	28.5	3	2	2	4	8	1	1
LCABL_28060	Aldo/keto reductase	37050	5	26.35	3	2	2	5	8	1	1
LCABL_12330	hypothetical protein	32333	6	28.28	3	3	6	6	7	1	1
LCABL_21280	hypothetical protein	25233	5	25.23	3	3	4	5	6	1	1
LCABL_08230	alpha/beta hydrolase	34475	6	23.23	3	3	3	3	5	2	2
LCABL_08720	bifunctional glycosyltransferase/transpeptidase penicillin-binding protein 18	68932	6	13.62	3	5	5	3	3	2	2
LCABL_19600	response regulator	25895	4	21.88	3	1	1	4	8	1	1
LCABL_18400	Methionyl-tRNA formyltransferase	34370	6	27.99	3	1	2	5	7	1	1
LCABL_02840	sugar ABC transporter periplasmic protein	46936	5	17.02	3	3	4	3	5	1	1
LCABL_12720	hypothetical protein	23272	3	24.06	3	2	2	3	2	4	3
LCABL_07300	Galactokinase	42475	3	11.34	3	1	1	2	5	3	3
LCABL_05050	glutamine amidotransferase class-I-peptidase C26	27762	4	29.6	3	2	3	3	3	2	3
LCABL_18270	peptide ABC transporter ATP-binding protein	37944	4	19.12	3	2	2	3	5	2	2
LCABL_26070	cell surface protein	81078	3	5.27	3	2	3	3	4	2	2
LCABL_02130	aspartate racemase	28260	4	31.2	3	1	1	4	7	1	1

LCABL_10930	hypothetical protein	ORF28	18605	4	3	32,93	1	1	1	4	7	1	1
LCABL_19560	beta-lactamase-like		26876	5	3	37,55	1	1	1	5	7	1	1
LCABL_13380	hypothetical protein		12023	4	2	38,74	2	4	2	2	2	2	2
LCABL_20300	peptidase, S9 family	yukL	73595	4	3	8,36	1	1	1	4	4	1	1
LCABL_06340	deoxyribose-phosphate aldolase (phosphodeoxyriboaldolase) (deoxyriboaldolase) (DERA)	deoC	26425	3	1	18,75	1	2	2	3	5	1	1
LCABL_27460	large-conductance mechanosensitive channel	mscL	18531	3	3	21,95	1	1	1	2	3	1	3
LCABL_25160	hypothetical protein		44227	1	1	2,51	1	2	1	2	2	1	3
LCABL_17430	Histidine-RNA ligase	hisS	47565	4	3	17,8	1	1	1	3	4	2	2
LCABL_15690	Fructose-specific phosphotransferase system, enzyme IABC	fruA	69974	2	2	5,79	1	2	2	2	3	1	2
LCABL_01100	S05 ribosomal protein L9	rplL	16962	4	3	35,76	1	1	1	4	5	1	1
LCABL_15610	ATP-dependent protease ATP-binding protein ClpX	clpX	45753	3	1	8,89	1	1	1	3	5	1	1
LCABL_02650	branched-chain amino acid ABC transporter substrate-binding protein	lva	41746	3	2	15,37	1	2	2	3	4	1	1
LCABL_09500	polysaccharide transport membrane protein		60623	1	1	1,65	1	2	1	2	4	1	1
LCABL_11810	YbbR	ybbR	38199	3	3	13,57	1	1	1	1	1	3	4
LCABL_20250	serine-type D-Ala-D-Ala carboxypeptidase	ppbX2	44161	5	3	17,13	1	1	1	1	1	4	4
LCABL_00600	MMP1 precursor		116912	4	4	7,8	1	1	1	3	3	2	2
LCABL_18880	hypothetical protein		42156	3	2	9,4	1	2	2	2	2	2	2
LCABL_10240	GMP reductase	gucC	36504	3	1	16,72	1	1	1	3	4	1	1
LCABL_27150	peptidyl-RNA hydrolase	pth	20820	3	3	16,22	1	1	1	3	4	1	1
LCABL_08260	hypothetical protein		33349	3	2	14,29	3	2	2	3	3	1	1
LCABL_22940	acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxyl carrier protein	accB	15935	3	3	57,72	1	2	2	2	3	1	1
LCABL_03250	RbsB (ribose ABC transporter) (ribose-binding protein)	rbsB	33282	4	1	19,12	3	1	1	2	2	2	2
LCABL_28900	hypothetical protein		42314	1	3	2,92	1	1	1	1	2	1	2
LCABL_03660	beta-lactamase class A		30333	2	2	11,07	1	1	1	2	3	1	1
LCABL_08590	hypothetical protein	ylbB	18375	2	2	28,05	3	1	1	2	3	1	1
LCABL_11850	hypothetical protein		18880	3	1	10,43	1	1	1	2	2	3	1
LCABL_18860	transcription elongation factor GreA (transcriptcleavage factor GreA)	greA	17172	4	4	30,13	3	1	1	3	3	1	1
LCABL_23860	cytochrome D ubiquinol oxidase subunit 1	cydA	53521	1	1	1,48	3	1	1	1	1	1	1
LCABL_25180	Probable potassium transport system protein Kup	kup	76719	1	1	1,17	1	1	1	1	3	1	1
LCABL_18520	Farnesyl-diphosphate synthase	ispA	29804	2	2	15	3	2	2	2	2	1	1
LCABL_24410	Thymidylate kinase	tkk	23702	2	2	10,75	3	1	1	2	2	1	1
LCABL_24340	hypothetical protein		19037	1	1	5,23	3	1	1	3	1	1	1
LCABL_26620	S05 ribosomal protein L29	rplM	7877	1	1	19,12	3	1	1	1	1	1	2
LCABL_02950	phosphotransferase system sugar-specific EII component	PTS-EII	13472	3	1	30,16	3	1	1	2	2	1	1
LCABL_13370	Major tail protein	mtp	21877	1	1	6,03	3	1	1	1	2	1	1
LCABL_19400	cell-cycle regulation Hit-like protein	hit	16179	3	1	26,39	3	1	1	2	2	1	1
LCABL_19450	bifunctional glycosyltransferase/transpeptidase penicillin binding protein 2A	pbp2A	74852	3	2	6,47	3	1	1	2	2	1	1
LCABL_27970	glycine betaine/carnitine/choline ABC transporter substrate-binding and permease	chsS	55523	3	1	5,1	3	1	1	2	2	1	1
LCABL_21460	peptidase M42 family	ydcC	39832	1	1	3,32	3	1	1	1	1	1	1
LCABL_26530	S05 ribosomal protein L30	rplM	6749	1	1	27,87	3	1	1	1	1	1	1
LCABL_26820	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	rpoB	133682	39	2	52,38	2	10	11	39	80	1	1
LCABL_11110	hypothetical protein		43721	17	2	48,9	2	15	36	6	14	29	30
LCABL_07620	hypothetical protein		31858	14	6	58,7	2	6	6	14	29	6	6
LCABL_26990	lysyl-HRNA synthetase	lysS	56537	14	5	37,15	2	7	7	14	14	23	23
LCABL_21820	glucose-1-phosphate thymidyltransferase	rmlA	32341	13	2	53,45	2	1	1	13	28	28	28
LCABL_16750	Carbamoyl-phosphate synthase large chain	carB	115985	18	3	25,57	2	3	3	18	26	26	26
LCABL_02440	oligoneuridylase F1	pepF1	67252	14	2	35,23	2	2	2	14	25	25	25
LCABL_20260	nicotinate phosphoribosyltransferase	nadC	54686	15	2	40,66	2	7	7	14	20	20	20
LCABL_08250	2,5-diketo-D-gluconate reductase	dig	30879	13	6	69,34	2	8	8	12	19	19	19
LCABL_02430	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	mmxB	30727	14	2	1	1	1	1	14	25	25	25
LCABL_28460	alpha-glucosidase	agl2	65343	16	2	43,93	2	2	2	15	22	22	22
LCABL_08120	peptidase M3B, oligoneuridylase F	agl2	67986	12	3	30,02	2	3	3	12	21	21	21
LCABL_18290	Phosphate acyltransferase	phxX	36174	9	4	32,55	2	5	5	9	19	19	19
LCABL_26830	ATP-dependent Clp protease ATP-binding protein ClpC	clpC	91748	15	2	27,19	2	2	2	15	21	21	21
LCABL_13810	Uracil phosphoribosyltransferase	upp	22809	9	3	52,63	2	3	3	9	18	18	18
LCABL_02890	tagatose-6-phosphate ketose/aldose isomerase	agsS	42754	10	2	31,55	2	2	2	8	14	14	14
LCABL_27300	ATP-dependent RNA helicase	srmB	56311	13	2	40,24	2	2	2	13	18	18	18
LCABL_15800	2,3-cyclic-nucleotide 2-phosphodiesterase	yjM	56754	14	2	54,74	2	1	1	14	19	19	19
LCABL_11860	UPF082 protein LCABL_11860		27106	9	2	35,8	2	1	1	9	18	18	18
LCABL_02040	GTP-dependent nucleic acid-binding protein EngD		40293	8	2	36,14	2	2	2	8	13	13	13
LCABL_10420	Protein translocase subunit SecA	secA	89367	11	4	21,09	2	4	4	11	14	14	14
LCABL_19840	Peptide chain release factor 3	prfC	59493	11	2	28,63	2	2	2	11	15	15	15
LCABL_31030	Manitol-1-phosphate 5-dehydrogenase	mid	42453	6	2	20,63	2	2	2	5	10	10	10
LCABL_02870	mannose-6-phosphate isomerase	manA	36016	8	2	44,58	2	1	1	8	14	14	14
LCABL_00070	deoxyribose-phosphate aldolase (phosphodeoxyriboaldolase) (deoxyriboaldolase) (DERA)	deoC	25375	10	2	47,86	2	2	2	10	13	13	13
LCABL_02120	UDP-N-acetylmuramoylalanine-D-glutamate--2, 6-diaminopimelate ligase	murE	56659	8	2	27,08	2	1	1	8	13	13	13
LCABL_27500	ribose-phosphate pyrophosphokinase	prs	35443	6	3	33,02	2	3	3	6	11	11	11
LCABL_11680	UDP-N-acetylenolpyruvylglucosamine reductase (UDP-N-acetylmuramate dehydrogenase)	murB	32237	4	2	18,27	2	4	4	4	8	8	8

LCABL_14850	rod shape-determining protein MreB	mreB	34983	8	36,64	2				13	1	1
LCABL_27080	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	hpt	20289	8	54,14	2				8	1	1
LCABL_15290	mRNA degradation (ribonuclease J1/J2, metallo-beta-lactamase superfamily enzyme)		61597	10	18,93	2				10	1	1
LCABL_15420	myo-inositol-1(Or 4)-monophosphatase	suib	28133	9	52,47	2	1			9	1	
LCABL_17390	endonuclease IV	rfi	31515	7	39,37	2	1			7	1	
LCABL_24880	Cysteine--rRNA ligase	lys	53502	8	23,72	2	1			8	1	
LCABL_26770	30S ribosomal protein S12	rpsL	15174	3	34,78	2	1			3	1	
LCABL_03550	esterase C	estC	29012	6	37,45	2	1			6	1	
LCABL_10730	UFPO42 nucleotide-binding protein LCABL_10730	xpt	21353	5	26,56	2	3			5	1	
LCABL_12770	Xanthine phosphoribosyltransferase	WkaA protein	61537	10	33,88	2	1			10	1	
LCABL_07180	YkaA protein	trmE	50157	8	29,65	2	1			8	1	
LCABL_31230	rRNA modification GTPase TrmE	lipid kinase	37318	9	31,98	2	2			9	1	
LCABL_12250	lipid kinase		37318	9	31,98	2	2			9	1	
LCABL_09910	Major tail protein, phi13 family	metK	23602	5	39,53	2	5			5	3	4
LCABL_09430	S-adenosylmethionine synthase	glutamine ABC transporter ATP-binding protein	43000	5	14,97	2	2			5	1	1
LCABL_15660	glutamine ABC transporter ATP-binding protein	glhQ3	27311	9	54,03	2	1			9	1	
LCABL_16470	Yajl	yajl	23076	7	41,23	2	1			7	1	10
LCABL_20410	phosphoenolpyruvate carboxylase (ATP)	pck	60985	8	22,88	2	1			8	1	
LCABL_04890	myosin-cross-reactive antigen		64327	7	18,09	2	2			7	9	
LCABL_15560	hydrolase of the metallo-beta-lactamase superfamily		62324	7	20,89	2	1			7	9	
LCABL_07610	hypothetical protein		39636	7	28,97	2	2			7	5	5
LCABL_20020	pyruvate oxidase	pxoL	63962	8	20,55	2	1			8	9	
LCABL_29080	hypothetical protein		3333	6	32,88	2	2			6	8	
LCABL_17270	glycyl-RNA synthetase subunit alpha	glyC	30051	5	32,18	2	3			5	7	
LCABL_20280	N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase	nagA	42325	7	28,61	2	2			7	6	6
LCABL_30330	EIC	manM	27738	1	6,27	1	1			1	4	4
LCABL_14780	cysteine desulfurase / Selenocysteine lyase	nifS	41895	5	17,92	2	2			5	1	4
LCABL_17080	aspartate aminotransferase	aspB	42486	5	23,27	2	4			5	3	4
LCABL_21810	RncC	rncC	21456	5	42,63	2	2			5	4	4
LCABL_11530	exonuclease of the beta-lactamase fold	Ysh1	46711	6	21,2	2	2			6	8	2
LCABL_08190	acetyltransferase	wecD	19203	6	68,79	2	1			6	6	2
LCABL_20730	hypothetical protein	yneB	29963	4	33,09	2	1			4	8	8
LCABL_21550	Pantothenate kinase	coaA	36060	5	24,03	2	1			5	5	8
LCABL_31080	hypothetical protein	yraE	28651	5	42,53	2	1			5	8	8
LCABL_07320	Galactose-1-phosphate uridylyltransferase	galT	54128	5	14,61	2	2			5	7	7
LCABL_22890	Cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	cfa	45242	5	21,63	2	2			5	4	4
LCABL_00020	DNA-directed DNA polymerase III subunit beta	dnaN	41457	4	13,46	2	2			4	5	5
LCABL_08910	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	pilB	21286	2	18,56	2	2			2	8	1
LCABL_23950	universal stress protein, UspA family	usp5	16220	3	35,14	2	1			3	7	7
LCABL_27430	HD superfamily phosphohydrolase	gpsA	52163	4	13,3	2	1			4	4	4
LCABL_10610	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(P)+]	glpD	37673	4	20,8	2	2			4	6	6
LCABL_30100	hypothetical protein	ycl	29681	4	18,49	2	2			4	6	6
LCABL_08760	Biotin-l-phenyl-CoA-carboxylase] ligase	birA	26632	4	28,4	2	1			4	4	6
LCABL_24350	L-asparaginase	aspA1	34987	4	18,52	2	1			4	6	6
LCABL_15200	cysteine desulfurase	sdg2	41842	3	8,01	2	2			3	2	2
LCABL_30320	EID	manM	33473	5	21,78	2	2			5	2	2
LCABL_08350	S-adenosylmethionine tRNA ribosyltransferase-isomerase	queA	40417	5	16,85	2	2			5	6	1
LCABL_13870	ATP synthase gamma chain	atpG	33709	5	30,52	2	2			5	6	1
LCABL_08890	low temperature requirement protein C	lrcC	18604	3	30,54	2	1			3	5	1
LCABL_10690	hydrolase of HD superfamily		25000	4	30,7	2	2			4	4	4
LCABL_09920	phage protein	inil	13710	3	53,72	2	2			3	4	2
LCABL_25040	internalin-J precursor		44767	5	21,75	2	2			5	1	1
LCABL_02300	hypothetical protein		53821	2	5,38	2	1			2	4	5
LCABL_04630	flavodoxin		23491	3	32,21	2	1			3	4	4
LCABL_06830	5-methyltetrahydropteroyltryglutamate--homocysteine S-methyltransferase	metE	86687	2	5,26	2	1			2	3	4
LCABL_09580	hypothetical protein		18974	2	21,25	2	1			2	4	4
LCABL_10550	phosphate transporter protein	phoU	25875	3	16,89	2	1			3	4	4
LCABL_16960	Lipoate-protein ligase	lipA1	38457	4	15,73	2	1			4	4	4
LCABL_16980	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	serA	33584	2	9,97	2	1			2	4	4
LCABL_19350	rRNA (guanine-N(7))-methyltransferase	trmB	24946	3	17,76	2	1			3	4	4
LCABL_21890	glutamine transport ATP-binding protein	glhQ	27426	2	13,47	2	1			2	4	4
LCABL_15810	hypothetical protein		31751	3	7,26	2	2			3	2	2
LCABL_01600	acetate kinase	ackA	43235	3	8,33	2	2			3	1	3
LCABL_17790	protein gpe (HSP-70 cofactor)	gpeE	21776	2	13,78	2	2			2	2	3
LCABL_08270	alpha/beta hydrolase superfamily protein	malK	31172	2	11,03	2	2			2	2	3
LCABL_11570	sugar ABC transporter ATPase	ycbB	39001	3	17,27	2	3			3	1	2
LCABL_27220	YcbB protein		26536	2	11,11	2	2			2	2	2
LCABL_13850	ATP synthase subunit delta	atpH	19361	3	33,7	2	2			3	4	1



LCABL_07010	ARA1 protein	ara1	31065	4	20.64	1	1	4	7
LCABL_12550	phosphomevalonate kinase	mvaK2	39171	4	13.17	1	1	4	7
LCABL_15980	Cytidylyate kinase	cmk	24519	5	24.43	1	1	5	7
LCABL_29370	protein tyrosine phosphatase I	ptp3	29128	6	48.85	1	1	6	7
LCABL_27620	phosphotransferase system sugar-specific EII component	PTS-EII	17694	5	47.5	1	1	5	7
LCABL_24360	Oleoyl-lacy-carrier protein thioesterase I	fat	28816	5	23.89	1	1	5	6
LCABL_08060	malate dehydrogenase	mleS	60407	3	8.83	1	1	3	6
LCABL_11610	Uracil-DNA glycosylase	ung	25073	3	19.3	1	1	3	6
LCABL_14240	deoxyguanosine kinase	duka	27357	5	33.47	1	1	5	6
LCABL_15050	cell division protein, FtsZ	ftsZ	44295	5	20.29	1	1	5	6
LCABL_18260	peptide ABC transporter ATP-binding protein	oppF	36347	6	29.97	1	1	6	6
LCABL_20270	transcriptional regulator	gntR	26554	5	33.91	1	1	5	6
LCABL_27590	dimethyladenosine transferase (S-adenosylmethionine-6-N, N-adenosyl(rRNA) dimethyltransferase) [L65-rRNA dimethylase] (HtlI ksgA)	htlI ksgA	32683	6	28.48	1	1	6	6
LCABL_27980	ATP-dependent DNA helicase	rep	85695	4	8.53	1	1	4	6
LCABL_29680	nicotinamidase	pncA	20614	4	49.46	1	1	4	6
LCABL_01950	Pyrrolidone-carboxylate peptidase	pcp	23446	3	21.4	1	1	3	5
LCABL_01960	dinucleotide-binding enzyme	ppp	21629	3	31.55	1	1	3	5
LCABL_02080	Response regulator	rrp11	25528	5	32.02	1	1	5	5
LCABL_04220	L-sorbose-1-phosphate reductase	sofE	45157	3	13.83	1	1	3	5
LCABL_05020	pyruvate oxidase	dicC	62724	5	14.04	1	1	5	5
LCABL_08390	metal regulatory protein EfaR (iron-dependent repressor)	efaR	23706	3	21.5	1	1	3	5
LCABL_08600	glutamate racemase	muri	52010	5	18.8	1	1	5	5
LCABL_08900	Ferredoxin-NADP reductase	frdK	35862	3	14.02	1	1	3	5
LCABL_10590	HP1-kinase/phosphorylase	hprK	35348	4	24.76	1	1	4	5
LCABL_14970	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase H	rsmH	34921	4	19.81	1	1	4	5
LCABL_15450	pyruvate carboxylase	pycA	124877	5	7.25	1	1	5	5
LCABL_18210	ribonuclease III	rnc	25916	5	36.8	1	1	5	5
LCABL_18390	RNA methylase I	sunI	48657	4	14.8	1	1	4	5
LCABL_20660	hypothetical protein	poE	20957	5	34.97	1	1	5	5
LCABL_27400	DNA-directed RNA polymerase subunit delta	poE	25162	4	18.83	1	1	4	5
LCABL_30510	fructosamine-3-kinase	gntK	31975	4	28.03	1	1	4	5
LCABL_02280	glucokinase	yibE	57090	3	9.96	1	1	3	4
LCABL_07000	oxidoreductase	purB2	22718	3	27.05	1	1	3	4
LCABL_12800	adenylosuccinate lyase	purB2	48508	4	12.76	1	1	4	4
LCABL_14020	ABC transporter ATP-binding protein	yvfB	28119	3	21.18	1	1	3	4
LCABL_14110	regulator	drcR	33850	3	11.86	1	1	3	4
LCABL_15740	Ribonuclease Z	mz	35026	3	16.56	1	1	3	4
LCABL_16070	thymidylate synthase	thyA	36582	3	13.29	1	1	3	4
LCABL_17220	SAM-dependent methyltransferase	mdgG	22149	4	20	1	1	4	4
LCABL_19620	Anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase activating protein	wze	27606	4	19.84	1	1	4	4
LCABL_23340	Wze	recR	21906	4	23.12	1	1	4	4
LCABL_24430	Recombination protein recR	recR	23276	4	30.99	1	1	4	4
LCABL_26000	MAD-dependent epimerase/dehydratase:3-beta hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase:NmrA-like		36895	3	23.12	1	1	3	4
LCABL_27000	rRNA-dihydrouridine synthase	yjlf	25322	4	28.07	1	1	4	4
LCABL_28110	phosphoglycerate mutase	murQ	30875	4	23.08	1	1	4	4
LCABL_29730	N-acetylmuramic acid-6-phosphate etherase	plG3	15737	3	37.91	1	1	3	4
LCABL_11270	P1G3	fold	29579	3	15.55	1	1	3	3
LCABL_18550	Functional protein FcID [Includes: Methylene tetrahydrofolate dehydrogenase ; Methylene tetrahydrofolate cyclohydrolase]	rpsF	11572	2	44.9	1	1	2	3
LCABL_00090	30S ribosomal protein S6	para	40460	3	15.08	1	1	3	3
LCABL_01330	Microcin C7 resistance McrC7 related protein	PTS-EIIB	27573	3	18.43	1	1	3	3
LCABL_02010	chromosome partitioning ATPase	wecD	24191	2	21.88	1	1	2	3
LCABL_02920	phosphotransferase system sugar-specific EIIB component	lacG	28569	3	15.66	1	1	3	3
LCABL_03080	acetyltransferase	laaB	53968	3	6.96	1	1	3	3
LCABL_05040	SAM (And some other nucleotide) binding motif	laaB	17312	2	20.39	1	1	2	3
LCABL_07280	6-phospho-beta-galactosidase	ynbB	18161	3	16.77	1	1	3	3
LCABL_08220	CBS domain containing protein	orf6	26394	1	5.29	1	1	1	3
LCABL_08630	YnfB (HAD-superfamily hydrolase, subfamily IA, variant 1 YnfB)	cof	29726	1	7.39	1	1	1	3
LCABL_08750	anti-repressor		28740	2	14.44	1	1	2	3
LCABL_10860	Cof protein		33004	2	11.78	1	1	2	3
LCABL_12280	hypothetical protein		14442	2	25.62	1	1	2	3
LCABL_12930	hypothetical protein		16918	2	15.48	1	1	2	3
LCABL_13140	hypothetical protein		30350	3	16.3	1	1	3	3
LCABL_13570	guanine deaminase		29178	3	25.87	1	1	3	3
LCABL_14920	glutamine ABC transporter substrate-binding protein		52056	3	8.32	1	1	3	3
LCABL_15080	YnfH (RNA-binding protein)		38444	2	10.92	1	1	2	3
LCABL_16290	ATP-dependent protease ATP-binding protein HslU		34819	3	13.97	1	1	3	3
LCABL_17800	Heat-inducible transcription repressor HrcA								
LCABL_17820	bifunctional protein: riboflavin kinase; FMN adenylyltransferase								

ICABL_17910	DNA polymerase III PolC	161491	3	3,67	1	3	3	
ICABL_18120	Ribosome maturation factor rimM	19029	2	10,47	1	2	2	
ICABL_18160	Signal recognition particle protein Ffh	52936	3	8,79	1	3	3	
ICABL_18440	guanylate kinase	23734	2	13,46	1	2	2	
ICABL_20090	Mro protein	30052	2	8,82	1	2	2	
ICABL_20130	acetyltransferase, GNAT family	17144	3	25,32	1	3	3	
ICABL_21110	peptide ABC transporter permease	35896	1	4,28	1	1	1	
ICABL_21450	D-aminopeptidase	32111	3	13,73	1	3	3	
ICABL_22000	thiamine biosynthesis lipoprotein	33126	3	16,83	1	3	3	
ICABL_23310	homoserine kinase	31133	3	14,48	1	3	3	
ICABL_27520	hypothetical protein	45469	2	4,53	1	2	2	
ICABL_29910	protein tyrosine phosphatase	28326	3	16,33	1	3	3	
ICABL_31090	hypothetical protein	10611	3	46,51	1	3	3	
ICABL_22640	hypothetical protein	20187	3	24,38	1	3	3	
ICABL_00250	peptide ABC transporter ATPase	25623	2	11,16	1	2	2	
ICABL_00720	tryptophan synthase subunit alpha	28510	2	9,85	1	2	2	
ICABL_01020	diaminopimelate epimerase	35962	2	17,31	1	2	2	
ICABL_01030	aspartate semialdehyde dehydrogenase	38087	2	10,8	1	2	2	
ICABL_01470	alanine acetyl transferase (YoaA protein)	21957	2	14,14	1	2	2	
ICABL_01740	hypothetical protein	69048	2	5,68	1	2	2	
ICABL_03390	hypothetical protein	12816	2	21,93	1	2	2	
ICABL_09060	peptidase I	45281	1	3,61	1	1	1	
ICABL_09800	inosine/uridine-preferring nucleoside hydrolase	33344	1	3,54	1	1	1	
ICABL_06900	beta-glucosides PTS, EIIABC	70418	1	5,1	1	1	1	
ICABL_07600	phosphomethylpyrimidine kinase	29507	2	10,62	1	2	2	
ICABL_09570	hypothetical protein	15836	2	23,08	1	2	2	
ICABL_10060	glutathione peroxidase	17484	2	14,01	1	2	2	
ICABL_10190	Copper homeostasis protein	22247	1	8,53	1	1	1	
ICABL_10480	response regulator	26711	2	17,87	1	2	2	
ICABL_11580	GNAT family acetyltransferase	21545	2	14,51	1	2	2	
ICABL_12050	Response regulator	27520	1	12,4	1	1	1	
ICABL_14420	DegV family protein	30332	1	12,98	1	1	1	
ICABL_15400	L-lactate dehydrogenase (L-LDH)	31636	1	3,04	1	1	1	
ICABL_15870	translation initiation factor IF-3	31878	2	10,62	1	2	2	
ICABL_16080	dihydrofolate reductase	18411	1	9,82	1	1	1	
ICABL_16330	DNA topoisomerase IV subunit A	90315	1	3,56	1	1	1	
ICABL_16360	transcriptional regulator	37307	1	8,07	1	1	1	
ICABL_16430	Response regulator receiver/transcriptional regulatory protein-like	25576	2	11,3	1	2	2	
ICABL_16720	Orotate phosphoribosyltransferase	22543	2	16,9	1	2	2	
ICABL_16740	dihydroorotate dehydrogenase 1B	29770	1	15,81	1	1	1	
ICABL_17350	phosphate starvation-inducible protein	35946	1	6,1	1	1	1	
ICABL_17570	Ribosomal protein L11 methyltransferase	33860	1	13,33	1	1	1	
ICABL_17700	transcriptional regulator	18397	1	10,18	1	1	1	
ICABL_19250	Transcriptional repressor NrdR	18017	2	20	1	2	2	
ICABL_19430	CMP-binding factor	36331	2	8,07	1	2	2	
ICABL_20810	citrate lyase subunit alpha	54604	2	3,73	1	2	2	
ICABL_21630	hypothetical protein	17046	1	29,41	1	1	1	
ICABL_21680	ABC transporter	27126	1	8,33	1	1	1	
ICABL_22020	glycogen phosphorylase	90799	2	4,49	1	2	2	
ICABL_23040	Butanol dehydrogenase	43216	2	8,82	1	2	2	
ICABL_23080	transcriptional regulator	15260	2	16,06	1	2	2	
ICABL_23320	threonine synthase	55442	2	8,13	1	2	2	
ICABL_23380	D-lactate dehydrogenase	34862	2	8	1	2	2	
ICABL_24190	hypothetical protein	13376	2	17,54	1	2	2	
ICABL_25360	glutamate 5-kinase (gamma-glutamyl) kinase [GK]	29749	2	17,33	1	2	2	
ICABL_25990	ABC transporter periplasmic protein	918	1	9,18	1	1	1	
ICABL_27850	SAM-dependent methyltransferase	29650	1	8,39	1	1	1	
ICABL_29520	acetyltransferase, GNAT family	18449	1	32,12	1	1	1	
ICABL_30130	response regulator	27099	2	20,68	1	2	2	
ICABL_30520	glutamine ABC transporter ATP-binding protein	26799	1	9,35	1	1	1	
ICABL_30550	YdaF (GCN5-related N-acetyltransferase)	20330	2	18,13	1	2	2	
ICABL_30800	Prophage Lp3 protein 2	23641	1	8,02	1	1	1	
ICABL_31020	Lipase	35680	2	9,12	1	2	2	
ICABL_31040	mannitol PTS, EIIA	16309	2	21,62	1	2	2	
ICABL_23390	Aromatic amino acid aminotransferase	41931	2	5,68	1	2	2	
ICABL_27290	Holo[acyl-carrier-protein] synthase	13631	1	13,71	1	1	1	
LACCB_2057	conserved protein of unknown function	11801	1	15,15	1	1	1	
ICABL_00960	dihydrodipicolinate reductase (DHPR)	27332	1	3,92	1	1	1	

LCABL_00970	Dihydrodipicolinate synthase	dapA	31991	1	7.97	1	1	1	1
LCABL_01220	anaerobic ribonucleoside triphosphate reductase	nrtd	82305	1	1.65	1	1	1	1
LCABL_02270	6-phosphogluconate dehydrogenase-like protein	gmtZ	32139	1	5.32	1	1	1	1
LCABL_04330	hypothetical protein		30887	1	5	1	1	1	1
LCABL_04700	hydrolase of the HAD superfamily		29349	1	5.51	1	1	1	1
LCABL_04730	phosphotransferase system sugar-specific EIIb component	PTS-EIIB	18058	1	10.43	1	1	1	1
LCABL_04780	oligo-1,6-glucosidase (oligosaccharide alpha-1,6-glucosidase) (Sucrase-isomaltase) (Dextrin 6-alpha-D-glucanohydrolase)		64966	1	2.13	1	1	1	1
LCABL_04960	DNA polymerase III subunit alpha (Gram-positive type)		53307	1	3.35	1	1	1	1
LCABL_05000	DNA-3-methyladenine glycosylase I	tag1	22030	1	6.28	1	1	1	1
LCABL_05060	glutamine synthetase (glutamate--ammonia ligase) (GS)	glnA	48925	1	4.7	1	1	1	1
LCABL_05110	NADPH:quinone reductase		37336	1	4.41	1	1	1	1
LCABL_05440	homoserine O-succinyltransferase	metA	31517	1	6.27	1	1	1	1
LCABL_06850	multifring ABC transporter ATPase/permease		63337	1	3.15	1	1	1	1
LCABL_06880	transcription regulator	treR	27449	1	7.14	1	1	1	1
LCABL_06980	organic hydroperoxide resistance protein	ohra	16276	1	7.53	1	1	1	1
LCABL_07100	carbonate dehydratase	cah	24987	1	4.5	1	1	1	1
LCABL_07470	lactose phosphotransferase system repressor	lacR1	28770	1	7.75	1	1	1	1
LCABL_07630	YwbB	ywbB	23070	1	15.28	1	1	1	1
LCABL_07820	NAD(P)H nitroreductase YdgJ	YdgJ	24782	1	5.02	1	1	1	1
LCABL_08010	hypothetical protein		32503	1	3.97	1	1	1	1
LCABL_08130	hypothetical protein		13036	1	14.66	1	1	1	1
LCABL_08330	Holliday junction ATP-dependent DNA helicase RuwA	ruwA	21032	1	5.05	1	1	1	1
LCABL_08520	MutS2 protein	mutS2	86082	1	2.8	1	1	1	1
LCABL_09520	sugar kinase		28561	1	6.96	1	1	1	1
LCABL_10200	Undecaprenyl-diphosphatase	uppP	30045	1	11.03	1	1	1	1
LCABL_10540	phosphate ABC transporter ATP-binding protein	pstB2	28321	1	4.72	1	1	1	1
LCABL_10800	hypothetical protein		29172	1	4.35	1	1	1	1
LCABL_10920	hypothetical protein		8642	1	37.97	1	1	1	1
LCABL_11660	DNA-directed DNA polymerase III subunit epsilon	dnaQ	20455	1	7.22	1	1	1	1
LCABL_11990	WbbM protein	wbbM	35672	1	7.23	1	1	1	1
LCABL_12160	hypothetical protein		43273	1	8.29	1	1	1	1
LCABL_12400	ATP-dependent RNA helicase	rhe2	47636	1	2.57	1	1	1	1
LCABL_12500	flavodoxin	flav	16711	1	11.76	1	1	1	1
LCABL_12920	hypothetical protein		16080	1	7.8	1	1	1	1
LCABL_12960	hypothetical protein		21680	1	5.73	1	1	1	1
LCABL_13050	RecT protein	recT	32026	1	4.18	1	1	1	1
LCABL_13110	hypothetical protein	Lip_1453	7996	1	22.86	1	1	1	1
LCABL_13280	hypothetical protein		10778	1	26.92	1	1	1	1
LCABL_13500	hypothetical protein	ycnE	10926	1	17.89	1	1	1	1
LCABL_13560	dehydrogenase related protein	ampC	33378	1	3.93	1	1	1	1
LCABL_13560	beta-lactamase family protein	hemK	38980	1	3.44	1	1	1	1
LCABL_13740	protoporphyrinogen oxidase ()	glyA	30943	1	4.35	1	1	1	1
LCABL_13780	Pyridoxal-phosphate-dependent serine hydroxymethyltransferase	sufB	44585	1	3.66	1	1	1	1
LCABL_14060	ABC transporter	sdhA-2	53518	1	2.3	1	1	1	1
LCABL_14190	L-serine dehydratase, iron-sulfur-dependent, alpha subunit	sdhA-2	29680	1	5.21	1	1	1	1
LCABL_14360	glutathione S-transferase	gst	24542	1	5.74	1	1	1	1
LCABL_14790	Probable tRNA sulfurtransferase	thi	45340	1	3.7	1	1	1	1
LCABL_15070	hypothetical protein	ycf19	11227	1	11.34	1	1	1	1
LCABL_15620	Probable GTP-binding protein EngB	engB	22216	1	6.57	1	1	1	1
LCABL_15890	reductase	ribT	15020	1	15.15	1	1	1	1
LCABL_16050	hypothetical protein		17532	1	5.3	1	1	1	1
LCABL_16210	GTP-binding protein	YloL	32002	1	4.2	1	1	1	1
LCABL_16340	formate C-acetyltransferase (pyruvate formate-lyase) (formate acetyltransferase)	pfib	85143	1	2.66	1	1	1	1
LCABL_16620	Fibronectin-binding protein A	fbpA	64277	1	2.65	1	1	1	1
LCABL_16730	Orotidine 5-phosphate decarboxylase (OMP decarboxylase) (OMPDecase) (OMPDecase)	pyrF	25484	1	5.86	1	1	1	1
LCABL_17160	tRNA and rRNA cytosine-C5-methylase		48796	1	3.16	1	1	1	1
LCABL_17170	hypothetical protein	rpoD	47515	1	4.5	1	1	1	1
LCABL_17240	DNA polymerase sigma factor RpoD	dnaG	66091	1	1.68	1	1	1	1
LCABL_17250	DNA primase G		17492	1	8.55	1	1	1	1
LCABL_17340	Probable rRNA maturation factor		16643	1	15.07	1	1	1	1
LCABL_17500	histidine triad (HT) protein	ycf	22970	1	9.09	1	1	1	1
LCABL_17520	hypothetical protein	dnaJ	41448	1	3.1	1	1	1	1
LCABL_17770	Chaperone protein DnaJ	trub	33235	1	4.58	1	1	1	1
LCABL_17830	tRNA pseudouridine synthase B	engC	33197	1	7.97	1	1	1	1
LCABL_18360	GTase engC	asp3	16585	1	7.19	1	1	1	1
LCABL_18570	alkaline shock protein	miaA	34363	1	4.53	1	1	1	1
LCABL_18720	tRNA dimethylallyltransferase		34763	1	6.52	1	1	1	1
LCABL_19130	NADPH:quinone reductase related Zn-dependent oxidoreductase			1		1	1	1	1



LCABL_19230	Primosomal protein Dnal (Helicase loader)	34435	1	3.54	1	1	1
LCABL_19310	cell division protein FtsK	88618	1	2.2	1	1	1
LCABL_19540	transcription regulator	16190	1	13.7	1	1	1
LCABL_19820	hypothetical protein	10984	1	20.62	1	1	1
LCABL_19870	acetyltransferase, GNAT family	16235	1	8.33	1	1	1
LCABL_19950	nucleoside 2'-deoxyribosyltransferase	17076	1	7.01	1	1	1
LCABL_20500	Internalin-H precursor	18947	1	7.65	1	1	1
LCABL_20960	nitro/flavin reductase	27858	1	7.17	1	1	1
LCABL_21070	ribosomal-protein-serine acetyltransferase	20754	1	10.38	1	1	1
LCABL_21140	SAZFO1-3 protein	25058	1	4.42	1	1	1
LCABL_21150	SAZFO1-2 protein	12167	1	15.45	1	1	1
LCABL_21230	extracellular zinc metalloproteinase (I)	26939	1	8.3	1	1	1
LCABL_21940	guanylate kinase	22668	1	8	1	1	1
LCABL_21950	acetyltransferase, GNAT family	15320	1	16.3	1	1	1
LCABL_22660	hydantoinase/oxoprolinase	54544	1	5.02	1	1	1
LCABL_22840	Sucrose-6-phosphate hydrolase (Fragment)	55309	1	2.85	1	1	1
LCABL_23010	MarR family transcriptional regulator	17334	1	8.05	1	1	1
LCABL_23180	serine-type D-Ala-D-Ala carboxypeptidase	39928	1	4.1	1	1	1
LCABL_23990	hypothetical protein	13958	1	18.18	1	1	1
LCABL_24100	GMP synthase	22513	1	5.83	1	1	1
LCABL_24300	Probable tRNA threonylcarbamoyladenosine biosynthesis protein Gcp	36289	1	5.28	1	1	1
LCABL_24390	DNA-directed DNA polymerase III delta prime subunit	35524	1	3.08	1	1	1
LCABL_24440	UFPO133 protein LCABL_24440	11253	1	39.39	1	1	1
LCABL_24460	Cytidine/deoxycytidylylate deaminase, zinc-binding region YaaJ	18173	1	8.93	1	1	1
LCABL_24640	amidase	51555	1	3.08	1	1	1
LCABL_24660	YvqK protein	20479	1	5.41	1	1	1
LCABL_24780	NADH dehydrogenase	70793	1	1.74	1	1	1
LCABL_24810	trans-hexaprenyltransferase, component II	36058	1	3.69	1	1	1
LCABL_24860	tRNA(rRNA) methyltransferase	27786	1	5.02	1	1	1
LCABL_24890	lactate dehydrogenase (oxido-reductase)	49565	1	2.59	1	1	1
LCABL_25090	DNA repair protein RadA	49127	1	3.52	1	1	1
LCABL_25190	pyruvate phosphate dikinase	95445	1	1.26	1	1	1
LCABL_25780	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR precursor	26107	1	7.79	1	1	1
LCABL_25900	AisR family transcriptional regulator	12385	1	23.64	1	1	1
LCABL_26340	TetR family transcriptional regulator	23451	1	6.9	1	1	1
LCABL_26480	SOS ribosomal protein L36	4448	1	26.32	1	1	1
LCABL_27100	S1 family RNA-binding protein	17356	1	9.32	1	1	1
LCABL_27410	Ywib	16903	1	9.46	1	1	1
LCABL_27540	ABC transporter ATP-binding protein	24086	1	6.48	1	1	1
LCABL_27750	MAD-dependent deacetylase (Regulatory protein SIR2 homolog)	25091	1	5.65	1	1	1
LCABL_28600	IcR family transcriptional regulator	28477	1	5.1	1	1	1
LCABL_29260	Nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase	27683	1	6.72	1	1	1
LCABL_30030	peptide ABC transporter substrate-binding (lipoprotein)	58496	1	2.24	1	1	1
LCABL_30050	coarct ABC transporter ATPase	64772	1	2.44	1	1	1
LCABL_30160	argininosuccinate synthase	44627	1	6.9	1	1	1
LCABL_30410	ABC transporter	27234	1	7.26	1	1	1
LCABL_31220	tRNA uridine 5-carboxymethylaminomethyl modification enzyme Gida	69876	1	1.74	1	1	1
LCABL_01230	hypothetical protein	26554	1	5.19	1	1	1
LCABL_09810	hypothetical protein	14493	1	7.81	1	1	1
LCABL_09970	hypothetical protein	15842	1	9.22	1	1	1
LCABL_11050	transcriptional activator rnaA	15534	1	5.97	1	1	1
LCABL_16820	lipoprotein signal peptidase	17614	1	11.04	1	1	1
LCABL_31140	hypothetical protein	42226	1	3.03	1	1	1
IACCB_1456	conserved protein of unknown function	5461	1	20.41	1	1	1
LCABL_09730	phage protein	8901	1	20	1	1	1
LCABL_10100	hypothetical protein	9514	1	17.05	1	1	1
LCABL_10330	XRE family transcriptional regulator	33098	1	5.83	1	1	1
LCABL_11000	hypothetical protein	11626	1	8.65	1	1	1
LCABL_15130	phosphate ABC transporter substrate-binding protein	31923	1	5.98	1	1	1
LCABL_17360	hypothetical protein	15871	1	8.33	1	1	1
LCABL_17760	Elongation factor 4	68892	1	1.8	1	1	1
LCABL_20100	succinyl-diaminomaleate desuccinylase (Lmo0265 protein)	40386	1	5.01	1	1	1
LCABL_25240	NAD-independent L-lactate dehydrogenase	39203	1	5.39	1	1	1
LCABL_25370	hypothetical protein	19691	1	6.18	1	1	1
LCABL_26300	hypothetical protein	32722	1	4.85	1	1	1
LCABL_31180	aminoacylase	42869	1	2.51	1	1	1

## 2. Demande de Brevet d'Invention

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
COURBEVOIE

①1 N° de publication : **3 118 060**  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **20 13717**

⑤1 Int Cl<sup>8</sup> : **C 12 N 1/21 (2022.01), A 61 L 2/16, A 23 L 3/357,  
B 65 D 81/24**

①2 **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION** **A1**

②2 **Date de dépôt** : 18.12.20.

③0 **Priorité** :

④3 **Date de mise à la disposition du public de la demande** : 24.06.22 Bulletin 22/25.

⑤6 **Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire** : *Se reporter à la fin du présent fascicule*

⑥0 **Références à d'autres documents nationaux apparentés** :

**Demande(s) d'extension** :

⑦1 **Demandeur(s)** : *Université de Bourgogne Etablissement Public National Scientifique, culturel et professionnel* — FR.

⑦2 **Inventeur(s)** : RIEU Aurélie, DA SILVA BARREIRA David et GUZZO Jean.

⑦3 **Titulaire(s)** : Université de Bourgogne Etablissement Public National Scientifique, culturel et professionnel.

⑦4 **Mandataire(s)** : NOVAGRAAF TECHNOLOGIES.

⑤4 **UTILISATION ANTI-BIOFILM DE VESICULES MEMBRANAIRES EXTRACELLULAIRES.**

⑤7 La présente invention se rapporte à une utilisation de vésicules membranaires extracellulaires d'au moins un probiotique pour prévenir ou réduire la formation d'un biofilm à la surface d'un matériau.

La présente invention se rapporte également à un procédé de traitement d'une surface d'un matériau pour prévenir ou réduire la formation d'un biofilm sur ladite surface, ledit procédé comprenant une étape de mise en contact de vésicules membranaires extracellulaires provenant d'au moins un probiotique avec ladite surface.

La présente invention se rapporte en outre à un matériau comprenant à sa surface des vésicules membranaires extracellulaires d'au moins un probiotique, ou dans lequel sont incorporées des vésicules membranaires extracellulaires d'au moins un probiotique.

Figure 2

FR 3 118 060 - A1







**Titre :** Biogenèse et rôles des vésicules membranaires de la bactérie à Gram positif *Lactocaseibacillus casei* BL23

**Mots clés :** Vésicules membranaires, probiotiques, prophages, biofilms

**Résumé :** Les bactéries à Gram positif de l'espèce *Lactocaseibacillus casei* (anciennement appelée *Lactobacillus casei*) sont des bacilles fermentaires présents dans les produits laitiers qui sont connus pour leurs propriétés anti-inflammatoires et leurs effets bénéfiques dans la lutte contre les pathogènes. Comme tous les organismes vivants, *L. casei* produit des nanostructures de 20 à 400 nm de diamètre délimitées par une membrane lipidique appelées vésicules membranaires (MVs). Les MVs ont été décrites comme pouvant contenir divers constituants cellulaires et exercer de multiples fonctions. Toutefois, malgré l'intérêt croissant accordé aux MVs de bactéries à Gram positif ces 10 dernières années, les mécanismes de biogenèse et les rôles exercés par ces vésicules restent encore peu caractérisés. Dans ce contexte, ce projet de thèse a pour objectifs (i) de caractériser les MVs libérées par la souche BL23 de *L. casei*,

(ii) d'identifier les mécanismes de biogenèse et enfin (iii) d'étudier les rôles exercés par ces MVs. Dans ce travail, nous avons mis évidence la production de MVs par *L. casei* BL23 grâce à des analyses de microscopie électronique, puis la taille et la composition protéique des MVs purifiées ont été étudiées. Sur la base des résultats de caractérisation, le rôle des prophages de *L. casei* BL23 dans la biogenèse des MVs a été examiné par une approche de mutagenèse dirigée. L'ensemble de nos résultats suggèrent une contribution du prophage PLE2 dans la production des MVs par *L. casei* BL23 en l'absence ou en présence de stress génotoxiques. Par ailleurs, nous avons mis en évidence une activité antibiofilm des MVs de *L. casei* BL23 sur un panel de bactéries pathogènes et de bactéries d'altération. Ainsi, ces résultats ouvrent la voie à l'utilisation de MVs de *L. casei* dans la lutte contre la formation de biofilms bactériens.

**Title :** Biogenesis and roles of the membrane vesicles of the Gram-positive bacterium *Lactocaseibacillus casei* BL23

**Keywords :** Membrane vesicles, probiotics, prophages, biofilms

**Abstract :** Gram-positive bacteria of the species *Lactocaseibacillus casei* (formerly known as *Lactobacillus casei*) are fermentative bacilli found in dairy products that are known for their anti-inflammatory properties and beneficial effects against pathogens. Like all living organisms, *L. casei* produces nanostructures of 20 to 400 nm in diameter bounded by a lipid membrane called membrane vesicles (MVs). MVs have been shown to contain various cellular constituents and exert multiple functions. However, despite the growing interest in Gram-positive MVs over the past 10 years, the mechanisms of biogenesis and the roles played by these vesicles remain poorly characterized. In this context, the objectives of this thesis project are (i) to characterize the MVs released by the *L. casei* strain BL23, (ii) to identify the biogenesis mechanisms

and finally (iii) to study the roles played by these MVs. In this work, we demonstrated the production of MVs by *L. casei* BL23 using electron microscopy, then the size and protein composition of the purified MVs were examined. Based on the characterization results, the contribution of *L. casei* BL23 prophages to the biogenesis of MVs was investigated by a site-directed mutagenesis approach. Our results suggest a contribution of the PLE2 prophage in the production of MVs by *L. casei* BL23 in the absence or presence of genotoxic stress. Furthermore, we also showed that the MVs of *L. casei* BL23 exhibited an antibiofilm activity against several pathogenic and spoilage bacteria. These results pave the way for the use of MVs of *L. casei* BL23 to fight against the formation of bacterial biofilms.